



①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

⑫ **Veröffentlichung**  
⑩ **DE 102 90 025 T 1**

⑥ Int. Cl. 7:  
**C 12 N 15/85**  
C 12 N 5/08  
C 12 N 5/10

der internationalen Anmeldung mit der  
⑧7 Veröffentlichungsnummer: WO 02/086107 in  
deutscher Übersetzung (Art. III § 8 Abs. 2 IntPatÜG)  
②1 Deutsches Aktenzeichen: 102 90 025.6  
⑧8 PCT-Aktenzeichen: PCT/EP02/04362  
⑧6 PCT-Anmeldetag: 19. 4. 2002  
⑧7 PCT-Veröffentlichungstag: 31. 10. 2002  
④3 Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung  
in deutscher Übersetzung: 9. 10. 2003

DE 102 90 025 T 1

③0 Unionspriorität:  
60/284531 19. 04. 2001 US

⑦1 Anmelder:  
DeveloGen Aktiengesellschaft für  
entwicklungsbiologische Forschung, 37079  
Göttingen, DE; Institut für Pflanzengenetik und  
Kulturpflanzenforschung, 06466 Gatersleben, DE

⑦4 Vertreter:  
Weickmann & Weickmann, 81679 München

⑦2 Erfinder:  
ST-Onge, Luc, Dr., 37077 Göttingen, DE; Hoffmann,  
Ursula, Dr., 37127 Jühnde, DE; Wobus, Anna M.,  
Dr., 06466 Gatersleben, DE; Blyszczuk, Przemyslaw,  
06466 Gatersleben, DE

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤4 Verfahren zur Differenzierung von Stammzellen in Insulin-produzierende Zellen

DE 102 90 025 T 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

25182P WO/WW

PCT/EP 02/04362

DeveloGen Aktiengesellschaft für entwicklungsbiologische Forschung

5

**Beschreibung****Gebiet der Erfindung**

Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren zur Differenzierung von Stammzellen in Insulin-produzierende Zellen durch Kultivierung solcher Zellen in speziell definierten Medien, und optimalerweise, Aktivierung von einem oder mehreren Genen, die in die Beta-Zelldifferenzierung involviert sind. Die vorliegende Erfindung stellt Mittel zur Behandlung von pankreatischen Erkrankungen, einem Stoffwechselsyndrom und Stoffwechselerkrankungen mit beeinträchtigten Glucosespiegeln, beispielsweise, aber nicht beschränkt auf Diabetes mellitus, Hyperglykämie und beeinträchtigter Glucosetoleranz bereit, durch Transplantieren der Insulin-produzierenden Zellen in diabetische Tiere und Menschen. Die Verfahren können weiterhin verwendet werden, um Zellen zur Identifizierung und Charakterisierung von Verbindungen, welche die Beta-Zelldifferenzierung, Insulinsekretion oder das Ansprechen auf Glucose stimulieren, zu erzeugen. Differenzierte Insulin-produzierende Zellen können auch verwendet werden, um die toxischen und andere Wirkungen von exogenen Verbindungen auf die Beta-Zellfunktion zu untersuchen.

**Hintergrund der Erfindung**

Diabetes, Hyperglykämie und beeinträchtigte Glucosetoleranz sind endokrine Erkrankungen, gekennzeichnet durch eine unzulängliche Produktion oder Verwendung von Insulin, was den Metabolismus von Kohlehydraten, Proteinen und Lipiden beeinflusst, was in anormalen Glucosespiegeln im Blut resultiert. Diabetes ist eine heterogene Erkrankung, die in zwei wichtige Gruppen eingeteilt werden kann: Typ 1 Diabetes (auch als Insulin-abhängige Diabetes,

IDDM, Typ I, juvenile Diabetes bekannt) und Typ 2 Diabetes (nicht Insulin-abhängige Diabetes, NIDDM, Typ II, Altersdiabetes).

Die funktionelle Einheit des endokrinen Pankreas ist die Langerhans-Insel, welche verstreut ist im exokrinen Anteil des Pankreas und aus vier Zelltypen zusammengesetzt ist: Alpha-, Beta-, Delta- und PP-Zellen. Beta-Zellen produzieren Insulin, stellen die Mehrheit der endokrinen Zellen dar, und bilden den Kern der Inseln, während Alpha-Zellen Glucagon sekretieren, und in der Peripherie lokalisiert sind. Delta-Zellen und PP-Zellen sind weniger zahlreich und sekretieren Somatostatin, beziehungsweise ein pankreatisches Polypeptid. Insulin und Glucagon sind die Schlüsselregulatoren von Blutglucose-Spiegeln. Insulin erniedrigt Blutglucose-Spiegel durch Erhöhen seiner zellulären Aufnahme und Umwandlung in Glycogen. Glucagon erhöht den Blutglucose-Spiegel durch Intervenieren in die Spaltung von Leberglycogen. Typ 1 Diabetes ist gekennzeichnet durch eine autoimmune Zerstörung von Insulin-produzierenden Beta-Zellen. Typ 2 Diabetes ist gekennzeichnet durch Insulin-resistenz und eine beeinträchtigte Glucosetoleranz, wobei Insulin nicht effizient genutzt wird oder in unzureichenden Mengen durch die Beta-Zellen produziert wird. Deswegen benötigen Patienten mit Typ 2 Diabetes oft zusätzliches Insulin, um die Blutglucose-Spiegel zu regulieren. Folglich besteht zwischen Patienten mit Typ 1 und Typ 2 Diabetes ein geringer therapeutischer Unterschied in der Verabreichung von Insulin (siehe Fajans in Diabetes Mellitus, fünfte Auflage; Porte und Sherwin, Ed.; Appleton & Lange, Pub. 1997, 1423ff.). Individuen, die an Diabetes leiden, müssen sich bis zu sechs Mal am Tag Insulin injizieren.

Trotz Insulininjektionen entwickeln Diabetes-Patienten Komplikationen, und ihre Anfälligkeit für Schlaganfälle, Blindheit, Amputationen, Nieren- und Herz-Kreislauf-Erkrankungen ist stark erhöht, während ihre Lebenserwartung verkürzt ist (Nathan (1993) N. Engl. J. Med. 328:1676-1685; Group, T.D.C. u. C.T.R. (1993) N. Engl. J. Med. 329:977-986). Der Ersatz fehlender Insulin-

13.08.03

DE 102 90 025 T1

3

produzierender Zellen durch Transplantation von Langerhans-Inselzellen oder Insulin-produzierenden Zellen ist eine vielversprechende therapeutische Option (Luzi et al. (1996) J. Clin. Invest. 97:2611-2618; Bretzel et al. (1996) Ther. Umsch. 53:889-901). Aber die Verfügbarkeit von humanem Spendergewebe

5 zur Transplantation ist stark beschränkt. Eine alternative Option wäre die Verwendung von tierischen Geweben aus Schweinen, aber ernsthafte technische Probleme müssen gelöst werden (Butler *et al.* (1998) Nature 391:320-324; Bach *et al.* (1998) Nature Med. 4:141-144; Shapiro *et al.* (2000) N. Engl. J. Med. 343:230-238), so wie eine Langzeit-Immunsuppression, und das Risiko, ein Schweine-Pathogen, so wie das endogene Schweine-Retrovirus, in die menschliche Population zu übertragen. Eine

10 Lösung für dieses Problem wäre es, eine humane „Ersatzzelle“ herzustellen, die dazu fähig ist, die Funktionen der fehlenden oder in der Funktion gestörten Beta-Zellen zu übernehmen. Daher besteht ein Bedarf zur Produktion einer unbegrenzten Menge von Insulin-produzierenden Ersatzzellen für die

15 Transplantation in diabetische Patienten. Die vorliegende Erfindung stellt diesen Bedarf durch Bereitstellen eines leichten Verfahrens zum Induzieren der Differenzierung von Stammzellen in funktionelle Insulin-produzierende Zellen zufrieden.

20 Stammzellen sind undifferenzierte oder unreife Zellen, die zu verschiedenen spezialisierten Zelltypen führen können. Stammzellen können, sobald sie differenziert sind oder induziert sind, um zu differenzieren, zur Reparatur beschädigter oder in der Funktion gestörter Organe verwendet werden.

25 Stammzellen können embryonalen oder adulten Ursprungs sein. Adulte oder somatische Stammzellen wurden in zahlreichen Geweben identifiziert, so wie Muskel, Knochenmark, Leber und Gehirn (Vescovi und Snyder (1999) Brain Pathol., 9:569-598; Seale und Rudnicki (2000) Dev. Biol., 218:115-124). Im Pankreas deuten mehrere Anzeichen darauf hin, dass Stammzellen auch

30 innerhalb des adulten Gewebes vorhanden sind (Gu und Sarvetnick (1993) Development, 118:33-46; Bouvens (1998) Micros Res Tech, 43:332-336;

Bonner-Weir (2000) J. Mol. Endocr., 24:297-302). Aber diese Population ist dürrftig definiert, und stellt einen sehr kleinen Prozentanteil der Zellen im Pankreas dar.

- 5 Embryonale Stammzellen können aus der inneren Zellmasse von Präimplantations-Embryonen (ES-Zellen), oder aus den primordialen Keimzellen, die in den Genitalleisten von postimplantierten Embryonen (EG-Zellen) gefunden werden. Sowohl ES- als auch EG-Zellen aggregieren und bilden Embryoid-Körper (EB, „Embryoid Bodys“), wenn sie bei speziellen Kultur-  
10 bedingungen, so wie in Spinnerkulturen oder hängenden Tropfen wachsen. EBs sind aus verschiedenen Zelltypen zusammengesetzt, ähnlich wie diejenigen, die während der Embryogenese vorhanden sind. Wenn sie in geeigneten Medien kultiviert werden, können EB verwendet werden, um *in vitro* differenzierte Phänotypen zu erzeugen, so wie extraembryonales  
15 Endoderm, hämatopoetische Zellen, Neuronen, Cardiomyocyten, Skelettmuskelzellen und vaskuläre Zellen. Bislang wurde kein Verfahren beschrieben, das eine effiziente Differenzierung von EB in Insulin-produzierende Zellen ermöglicht.
- 20 Soria und Kollegen beschreiben ein Verfahren zur Selektion von Insulinsekretierenden Zellklonen aus ES-Zellen unter Verwendung eines Zell-Einfang-Systems, worin Zellen mit einem Plasmid transfiziert werden, das die Expression eines Neomycin-Resistenzgens unter der Kontrolle der regulatorischen Region des humanen Insulingens erlaubt. Zellen von einem  
25 Insulin-sekretierenden Zellklon wurden in die Milz von diabetischen Mäusen implantiert. Die implantierten Zellen können die Blutglucose-Spiegel normalisieren und können bei den behandelten Tieren das Körpergewicht wieder herstellen (Soria *et al.* (2000) Diabetes 49:157-162). Ein Nachteil dieser Selektionsmethode ist aber ihre geringe Effizienz.

Lumelsky und Kollegen (Lumelsky *et al.* (Mai 2001) Science 292:1389-1394) haben Insulin-produzierende Zellen aus Maus ES-Zellen erzeugt. Die ES-Zellen werden auf einer Gelatine-beschichteten Gewebekulturoberfläche ohne Versorgungs-Zellen und in Gegenwart von LIF expandiert. Dann werden die Embryoid-Körper in einer Suspension in ES-Zellmedium in Abwesenheit von LIF erzeugt. In einem weiteren Schritt wurden Nestin-positive Zellen in einem Serum-freien Medium (ITSFn) auf einer Gewebekulturoberfläche selektiert. Resultierende pankreatische endokrine Vorläuferzellen werden expandiert, und die Differenzierung und Morphogenese von Insulin-sekretierenden Inselzellhaufen wird induziert. Aber die Insulin-sekretierenden Inselzellhaufen stellten, wenn sie in diabetische Mäuse transplantiert wurden, die normalen Blutglucose-Spiegel nicht wieder her.

Assady *et al.* ((August 2001), Diabetes, 50:1-7) beschreiben eine spontane *in vitro*-Differenzierung von pluripotenten humanen embryonalen Stammzellen in Zellen, die die Charakteristika von Insulin-produzierenden Zellen aufweisen. Es wurde eine Sekretion von Insulin in das Medium in einer Differenzierungs-abhängigen Art und Weise beobachtet, die mit dem Auftreten von anderen  $\beta$ -Zellmarkern assoziiert war. Aber die Effizienz der Differenzierung war gering, wobei nur 1-3% der differenzierten Zellen hinsichtlich Insulin positiv waren.

Die vorliegende Erfindung zielt auf eine Induktion der Differenzierung von ES-Zellen in Insulin-produzierende Zellen durch Aktivierung spezifischer Gene, und unterscheidet sich deshalb von den Verfahren des Standes der Technik, die dazu entworfen wurden, um solche Zellen zu selektieren.

In den letzten Jahren wurde von mehreren Genen gezeigt, dass sie für die Bildung von pankreatischen endokrinen Zellen während der Embryogenese wesentlich sind (Edlund (1998) Diabetes, 47:1817-1823; St-Onge *et al.* (1999) Curr.Opin. Genet. Dev., 9:295-300). Die Pankreas-Entwicklung involviert eine Reihe von induktiven Signalen, die von den umgebenden

mesodermalen Geweben ausgehen, und von Transkriptionsfaktoren, die in dem Pankreas-Epithel exprimiert werden. Die Homöobox, die den Transkriptionsfaktor Pdx1 (auch als Idx1, STF1, IPF1 bezeichnet) enthält, wird in allen Zellen der Pankreasanlagen während der Entwicklung exprimiert, und wird in adulten tierischen Lebewesen auf die Beta-Zellen beschränkt. Pdx1 Mäusemutanten entwickeln weder exokrines noch endokrines Gewebe und besitzen keinen Pankreas (Jonsson *et al.* (1994) *Nature*, 371:606-609; Ahlgren *et al.* (1996) *Development*, 122:1409-1416; Offield *et al.* (1996) *Development*, 122:983-995). Der fundamentale Helix-Loop-Helix-Transkriptionsfaktor Neurogenin 3 (ngn3) wird zur Spezifizierung des frühen endokrinen Vorläufers im Pankreas-Epithel benötigt, und wird herunter reguliert, sobald eine endokrine Differenzierung beginnt (Apelqvist *et al.* (1999) *Nature*, 400:877-881; Jensen *et al.* (2000) *Diabetes*, 49:163-176; Gradwohl *et al.* (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 97:1607-1611). Zwei Mitglieder der Pax-Genfamilie, Pax4 und Pax6, sind wesentlich für eine richtige Differenzierung von endokrinen Zellen im Pankreas (Sosa-Pineda *et al.* (1997) *Nature*, 386:399-402; St-Onge *et al.* (1997) *Nature*, 397:406-409; Sanders *et al.* (1997) *Genes Dev.*, 11:1662-1673). Beide Pax-Gene werden früh in der Entwicklung in einem Teil der endokrinen Vorläuferzellen des Pankreas-Epithels exprimiert, vor der Differenzierung der reifen Hormon-produzierenden Zellen. Mäuse, denen Pax4 fehlt, scheitern darin, überhaupt Beta-Zellen zu entwickeln und sind diabetisch, während in Pax6 Mäusemutanten die Alpha-Zellpopulation nicht vorhanden ist. Nkx2,2, Nkx6,1, Nkx6,2, Isl1 und NeuroD zählen auch zu den essentiellen Transkriptionsfaktoren, die für die richtige Differenzierung und Funktion von Beta-Zellen erforderlich sind.

Mehrere Tiermodelle für die Beta-Zellregeneration deuten darauf hin, dass die Mechanismen, die im adulten Organismus in die Beta-Zelldifferenzierung involviert sind, ähnlich sind, wie die Mechanismen, die während der Embryogenese in die Beta-Zelldifferenzierung involviert sind. Gu und Savernick haben in transgenen Mäusen, die das Interferon-Gamma (IFN-Gamma)-Gen,

das in pankreatischen Inseln exprimiert wird, tragen, ein Modellsystem zur Untersuchung der Regeneration von pankreatischen Inseln und Beta-Zellregeneration etabliert. In diesem Modell werden aus pankreatischen Ductuszellen kontinuierlich neue Inselzellen (z.B. Beta, Alpha, Delta und PP-Zellen) gebildet (Gu und Savernick (1993) Development, 118:33-46). Sie zeigen, dass die Ductus-Zellproliferation und die Ductus-assoziierte Inselbildung in transgenen IFN-Gamma-Mäusen die Inselbildung während der Entwicklung rekapituliert, und die Expression der Pax4-, Pax6- und Pdx1-Gene erfordert. Obwohl zwischen den Genen, die in die Inselregeneration in adulten tierischen Organismen involviert sind, und die in die Beta-Zelldifferenzierung während der Embryogenese involviert sind, eine Verbindung besteht, wurde im Stand der Technik nicht gezeigt, dass eine Aktivierung solcher Gene in Stammzellen die Differenzierung in Insulin-produzierende Zellen induzieren kann.

15

#### **Zusammenfassung der Erfindung**

Die vorliegende Erfindung betrifft ein neuartiges Verfahren zur Differenzierung von Stammzellen in Insulin-produzierende Zellen durch Kultivierung solcher Zellen in speziell definierten Medien, und optimalerweise durch Aktivierung eines oder mehrerer Gene, die in die Beta-Zelldifferenzierung involviert sind. Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin Anwendungen im medizinischen und Diabetes-Bereich, die sich direkt aus dem Verfahren der Erfindung ergeben. Außerdem betrifft die vorliegende Erfindung Anwendungen zur Identifizierung und Charakterisierung von Verbindungen mit therapeutischen medizinischen Wirkungen oder toxikologischen Wirkungen, welche sich direkt aus dem Verfahren der Erfindung ergeben.

#### **Detaillierte Beschreibung der Erfindung**

Ehe die vorliegenden Verfahren beschrieben werden, wird klargestellt, dass diese Erfindung nicht auf die beschriebene besondere Methodik, die Protokolle, Zelllinien, Vektoren und Reagenzien beschränkt ist, da diese variieren können.



Es wird auch klargestellt, dass die Terminologie, die hierin verwendet wird, lediglich dem Zweck dient, spezielle Ausführungsformen zu beschreiben, und nicht beabsichtigt, den Umfang der vorliegenden Erfindung zu beschränken, welcher nur durch die beigefügten Ansprüche begrenzt wird. Solange es nicht anders angegeben ist, besitzen alle hierin verwendeten technischen und wissenschaftlichen Begriffe dieselben Bedeutungen, wie sie gemeinhin von einem Fachmann des Fachgebiets, das die Erfindung betrifft, verstanden werden. Obwohl alle Verfahren und Materialien, die ähnlich oder äquivalent zu den hierin beschriebenen sind, in der Praxis oder Prüfung der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, werden nun die bevorzugten Verfahren, Vorrichtungen und Materialien beschrieben. Alle hierin erwähnten Publikationen werden hierin als Verweis einbezogen, um die Zelllinien, Vektoren und Methodiken, über die in den Publikationen berichtet wird, die in Verbindung mit der Erfindung verwendet werden können, zu beschreiben und zu offenbaren. Nichts hierin kann als ein Eingeständnis gedeutet werden, dass die Erfindung nicht dazu berechtigt ist, eine solche Offenbarung durch eine frühere Erfindung vorwegzunehmen.

Ein technisches Problem, das der Erfindung zugrunde liegt, ist es, ein Verfahren zur Erzeugung von Insulin-produzierenden Zellen zur Transplantation in Patienten bereitzustellen, die an pankreatischen Erkrankungen leiden, so wie zum Beispiel, aber nicht beschränkt auf, Hyperglykämie, beeinträchtigte Glucosetoleranz, Gestationsdiabetes und Diabetes mellitus. Die Lösung für besagtes technisches Problem wird durch die in den Ansprüchen beschriebenen Ausführungsformen erreicht.

Somit betrifft die vorliegende Erfindung Verfahren zur Differenzierung von Stammzellen in Insulin-produzierende Zellen, umfassend

- (a) Aktivierung eines oder mehrerer pankreatischer Gene in einer Stammzelle
- (b) Aggregieren der Zellen, um Embryoid-Körper zu bilden

- (c) Kultivierung der Embryoid-Körper in speziellen Differenzierungsmedien, die die  $\beta$ - Zelldifferenzierung verbessert
- (d) Identifizierung und Selektion von Insulin-produzierenden Zellen und von pankreatischen Zellen.

5

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung bedeutet der Begriff „Stammzelle“ eine undifferenzierte oder unreife embryonale, adulte oder somatische Zelle, die zu verschiedenen spezialisierten Zelltypen führen kann. Der Begriff Stammzellen kann embryonale Stammzellen (ES) oder primordiale Keimzellen (EG) humanen oder tierischen Ursprungs einschließen. Die Isolierung und Kultur solcher Zellen ist Fachleuten gut bekannt (Thomson *et al.* (1998) Science 282:1145-1147; Shambloott *et al.* (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:13726-13731; US 6,090,622; US 5,914,268; WO 0027995; Notarianni *et al.* (1990) J. Reprod. Fert. 41:51-56; Vassilieva *et al.* (2000) Exp. Cell. Res. 258:361-373). Der Begriff „Stammzellen“ kann neurale Vorläuferzellen aus embryonalen, fötalen oder adulten neuronalen Geweben einschließen. Die Isolierung und Kultur solcher Zellen ist Fachleuten gut bekannt (Rao (Ed.), „Stem Cells and CNS Development“, Humana Press Inc., New Jersey (2001); Fedoroff und Richardson (Eds.), „Protocols for Neural Cell Culture“, Humana Press Inc., 3. Auflage, New Jersey (2001)).

Der Begriff „Insulin-produzierende Zelle“ bezeichnet eine Zelle, die in der Lage ist, Insulin zu exprimieren, zu produzieren und zu sekretieren.

Der Begriff „Kulturmedium“ bezeichnet ein geeignetes Medium, das fähig ist, Wachstum und Differenzierung von Stammzellen, bevorzugt ES- und EG-Zellen, zu unterstützen. Beispiele für geeignete Kulturmedien beim Praktizieren der vorliegenden Erfindung werden hergestellt auf Basis von Dulbecco's modifiziertem Eagle-Medium (DMEM, Life Technologies), ergänzt mit 15% hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (FCS, Gibco) und Zusätzen, so wie 2 mM L-Glutamin (Gibco),  $5 \times 10^{-6}$  M  $\beta$ -Mercaptoethanol (Serva) und 1:100 nicht

13.05.03

DE 102 90 025 T1

10

essentielle Aminosäuren (Gibco). Ein anderes Beispiel ist ein Kulturmedium, das Iscove's modifiziertes Dulbecco-Medium (IMDM, Gibco), ergänzt mit 20% FCS, 2 mM L-Glutamin (Gibco), 1:100 nicht essentielle Aminosäuren (Gibco) und 450  $\mu$ M  $\alpha$ -Monothioglycerol (Sigma) umfasst. Für Routinekulturen werden  
5 ES-Zellen auf einer Versorgungsschicht aus embryonalen Fibroblasten, die durch eine Behandlung für 3 Stunden mit 100  $\mu$ g/ml Mitomycin C inaktiviert wurden, gezüchtet.

Der Begriff „Differenzierungsmedium“ bezeichnet ein geeignetes Medium zur  
10 Induktion der Differenzierung von Stammzellen in Insulin-produzierende Zellen. Beispiele für geeignete Kulturmedien beim Praktizieren der vorliegenden Erfindung werden hergestellt auf Basis von Iscove's modifiziertem Dulbecco-Medium (IMDM, Gibco), ergänzt mit 20% fötalem Kälberserum (FCS), 2 mM L-Glutamin, 1:100 nicht essentielle Aminosäuren und 450  $\mu$ M  $\alpha$ -  
15 Monothioglycerol (Sigma). Außerdem kann solch ein Medium zwischen 1 ng/ml und 100  $\mu$ g/ml, bevorzugt 10 ng/ml epithelialen Wachstumsfaktor (EGF, „Epithelial Growth Factor“); zwischen 1 ng/ml und 100  $\mu$ g/ml, bevorzugt 2 ng/ml basalen Fibroblasten-Wachstumsfaktor (bFGF, „Basic Fibroblast Growth Factor“); zwischen 1 nM und 1 mM, bevorzugt 20 nM Progesteron, zwischen  
20 10 ng/ml und 100  $\mu$ g/ml, bevorzugt 100 ng/ml Wachstumshormon; zwischen 1 nM und 100  $\mu$ M, bevorzugt 5 nM Follistatin (R&D) oder zwischen 1 und 100 nM, bevorzugt 2 nM Activin (R&D) enthalten. Ein anderes Beispiel für geeignete Kulturmedien beim Praktizieren der vorliegenden Erfindung wird hergestellt auf Basis eines Gemischs aus Dulbecco's modifiziertem Eagle-  
25 Medium:Nährstoffgemisch F-12, (DMEM/F12, Life Technologies) ergänzt mit zwischen 100 ng/ml und 100  $\mu$ g/ml, bevorzugt 5  $\mu$ g/ml Insulin, zwischen 1 nM und 100 nM, bevorzugt 30 nM Natriumselenit, zwischen 100 ng/ml und 500  $\mu$ g/ml, bevorzugt 50  $\mu$ g/ml Transferrin, zwischen 100 ng/ml und 100  $\mu$ g/ml, bevorzugt 5  $\mu$ g/ml Fibronectin. Noch ein anderes Beispiel für geeignete  
30 Kulturmedien beim Praktizieren der vorliegenden Erfindung wird hergestellt aus auf Basis eines Gemischs aus Dulbecco's modifiziertem Eagle-

Medium:Nährstoffgemisch F-12 (DMEM/F12, Life Technologies), ergänzt mit zwischen 100 ng/ml und 100 µg/ml, bevorzugt 25 µg/ml Insulin, zwischen 1 nM und 100 nM, bevorzugt 30 nM Natriumselenit, zwischen 100 ng/ml und 500 µg/ml, bevorzugt 50 µg/ml Transferrin, zwischen 100 ng/ml und 100 µg/ml, bevorzugt 5 µg/ml Fibronectin, zwischen 500 ng/ml und 100 µg/ml, bevorzugt 1 µg Laminin, zwischen 10 µM und 500 µM, bevorzugt 100 µM Putrescin, zwischen 1 nM und 1 µM, bevorzugt 20 nM Progesteron, zwischen 100 µM und 100 mM, bevorzugt 10 mM Nicotinamid.

- 10 Zusätzlich sind extrazelluläre Matrix (ECM)-Proteine, so wie Laminin (zwischen 0,5 und 100 µg/ml, bevorzugt 1 µg/ml, SIGMA) oder Collagene oder komplexe Gemische aus Wachstumsfaktoren und ECM-Proteinen der Basalmembran (Matrigel R, Collaborative Research/Becton Dickinson, 1:3-Verdünnung = Stammlösung, Endkonzentration in den Kulturen = 1:10) enthalten, um die
- 15 Anzahl an pankreatischen Zellen zu erhöhen, sowie ihren Differenzierungsstatus zu verbessern.

- Der Begriff „terminales Differenzierungsmedium“ bezeichnet ein geeignetes Medium zur terminalen Differenzierung von Insulin-produzierenden Zellen.
- 20 Beispiele für geeignete Kulturmedien beim Praktizieren der vorliegenden Erfindung werden hergestellt auf Basis von Iscove'smodifiziertem Dulbecco-Medium (IMDM, Gibco), ergänzt mit 20% FCS, 2 mM L-Glutamin, 1:100 nicht essentielle Aminosäuren und 450 µM α-Monothioglycerol (Sigma). Außerdem kann solch ein Medium zwischen 1 nM und 100 µM, bevorzugt 2 nM Activin
- 25 A, zwischen 1 nM und 100 µM, bevorzugt 1 nM Betacellulin, zwischen 1 ng/ml und 100 µg/ml, bevorzugt 10 ng/ml humanen Wachstumsfaktor (HGF, „Human Growth Factor“), zwischen 1 nM und 100 µM, bevorzugt 10 nM Niacinamid und zwischen 1 ng/ml und 100 µg/ml, bevorzugt 2 ng/ml transformierenden Wachstumsfaktor 2Beta (TGF 2Beta, „Transforming
- 30 Growth Factor“) enthalten.

Der Begriff „pankreatisches Gen“ bezeichnet ein Gen oder sein Proteinprodukt, das involviert ist in oder erforderlich ist für die Pankreas-Entwicklung, mehr bevorzugt für die Beta-Zelldifferenzierung. Beispiele solcher Gene sind Pdx1 (Genbank-Signatur AH005712), Pax4 (Genbank-Signaturen XM004974, NM006193), Pax6 (Genbank-Signatur M93650), ngn3 (Genbank-Signaturen XM005744, NM020999, AJ133776), Nkx6,1 (Genbank-Signatur AH007313), Nkx6,2, Nkx2,2 (Genbank-Signatur AF019415), HB9 (Genbank-Signaturen XM049383, AF107457), BETA2/NeuroD (Genbank-Signaturen NM002500, XM002573), Isl1 (Genbank-Signatur NM002202), HNF1-alpha, HNF1-beta (Genbank-Signatur X71346) und HNF3 (Genbank-Signaturen AF176112, AF176111) humanen oder tierischen Ursprungs. Bevorzugte Gene sind Pdx1, Pax4, Pax6 und ngn3. Besonders bevorzugte Gene sind Pdx1, Pax4 und Pax6. Jedes Gen kann einzeln oder in Kombination verwendet werden.

Der Begriff „Aktivierung eines oder mehrerer pankreatischer Gene“ bedeutet Lieferung und Einführung der pankreatischen Gene oder Proteine in Stammzellen.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird die cDNA eines oder mehrerer pankreatischer Gene unter die Kontrolle einer regulatorischen Region gesetzt, die die Initiation der Transkription erlaubt, und mittels Transfektionsmethoden, so wie Elektroporation, Lipofektion, Calciumphosphat-vermittelt, DEAE-Dextrane und dergleichen, in eine Zelle eingeführt. Solche Verfahren und Systeme sind im Stand der Technik gut beschrieben und erfordern kein weiteres unangemessenes Experimentieren; siehe beispielsweise Joyner, „Gene Targeting; A Practical Approach“, Oxford University Press, New York, 1993; Mansouri, „Gene Targeting by Homologous Recombination in Embryonic Stem Cell, Cell Biology: A Laboratory Handbook“, zweite Auflage, Academic Press, 1998. Die Genexpression des pankreatischen Gens kann durch konstitutive Promotoren, so wie die Cytomegalie-Virus Promotor/-Enhancerregion oder induzierbare Promotoren, so wie das induzierbare

Tetracyclinsystem, sichergestellt werden. Expressionsvektoren können auch ein Selektionsmittel, so wie die Neomycin-, Hygromycin- oder Puromycin-Resistenzgene enthalten. Die Herstellung solcher Genexpressions-Vektoren ist im Stand der Technik gut bekannt; siehe Sambrook *et al.*, „Molecular Cloning, A Laboratory Manual“, dritte Auflage, CSH Press, Cold Spring Harbor, 2000; 5 Gossen und Bujard, (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5547-5551. Ein DNA-Transfer kann auch unter Verwendung eines viralen Lieferungssystems, so wie retroviralen Vektoren, adenoviralen Vektoren, adeno-assoziierten Virusvektoren und lentiviralen Vektoren, erzielt werden.

10

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform können Proteinprodukte von pankreatischen Genen direkt zu den Stammzellen geliefert werden. Zum Beispiel kann eine Proteinlieferung durch polykationische Liposomen (Sells *et al.* (1995) Biotechniques 19:72-76), Tat-vermittelte Protein-Transduktion 15 (Fawell *et al.* (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:664-668), und durch Fusionieren eines Proteins an das Zell-permeable Motiv, das von der PreS2-Domäne des Hepatitis B-Virus abgeleitet ist (Oess und Hildt (2000) Gene Ther. 7:750-758), erreicht werden. Herstellung, Produktion und Reinigung solcher Proteine aus Bakterien, Hefe oder eukaryotischen Zellen sind Fachleuten gut 20 bekannt.

Eine zusätzliche Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zum Aggregieren von Stammzellen, bevorzugt ES- und EG-Zellen, um Embryoid-Körper zu bilden. Embryoid-Körper können durch ein Verfahren 25 mit hängenden Tropfen erzeugt werden. Zum Beispiel werden zwischen 400-800 ES-Zellen, bevorzugt 600, in Tropfen von 20  $\mu$ l Iscove'smodifiziertem Dulbecco-Medium (IMDM, Gibco), ergänzt mit 20% FCS, L-Glutamin, nicht essentiellen Aminosäuren und  $\alpha$ -Monothioglycerol, auf den Deckeln von Petrischalen platziert, die mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) gefüllt 30 sind. Embryoid-Körper werden für 2 Tage bei 37°C mit 5% CO<sub>2</sub> in hängenden Tropfen kultiviert, und dann in bakteriologische Petrischalen (Greiner,

13.08.03

DE 102 90 025 T1

14

Deutschland) transferiert, und für weitere 3 Tage in einer Suspensionskultur inkubiert. Nach 5 Tagen werden die Embryoid-Körper auf Gelatine-beschichtete 24-Well-Platten, Petrischalen oder andere geeignete Kulturgefäße ausplattiert, und für weitere 15 bis 35 Tage bei 37°C mit 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Embryoid-  
5 Körper können auch in Spinner-Kulturen erzeugt werden. Zum Beispiel werden adhärente Stammzellen enzymatisch unter Verwendung von 0,2% Trypsin und 0,05% EDTA in PBS (Life Technologies) abgetrennt, und in einer Dichte von 10<sup>7</sup> Zellen/ml in siliconisierten 250 ml-Spinner-Flaschen (Life Technologies) ausgesät, die 100 Kulturmedium enthalten. Nach 24 Stunden werden 150 ml  
10 Kulturmedium bis zu einem Endvolumen von 250 zugegeben. Die Spinner-Flaschen werden mit 20 rpm unter Verwendung eines Rührer-Systems (Integra Biosciences) gerührt. Solche Verfahren sind im Fachgebiet gut bekannt, und können für eine industrielle Produktion ohne unangemessenes Experimentieren maßstäblich vergrößert werden.

15

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung werden Embryoid-Körper auf Petrischalen plattiert, die Differenzierungsmedium enthalten, und es wird ihnen ermöglicht, sich in Zeitspannen von 15 bis 50 Tagen, bevorzugt 20 bis 25 Tagen (in Abhängigkeit von den verwendeten Zelllinien; R1 Wildtyp-Zellen  
20 benötigen eine längere Differenzierung, um Insulin- oder Glucagon-positive Zellen zu bilden, als Pdx1\*- oder Pax4\*-Zellen) in Insulin-produzierende Zellen zu differenzieren. Im Verfahren der Erfindung wird ein hoher Anteil an Insulin-produzierenden Zellen erhalten. Nach einer Differenzierungszeit von 15 Tagen beträgt der Anteil von Insulin-produzierenden Zellen bevorzugt mindestens  
25 20%, mehr bevorzugt mindestens 40% und am meisten bevorzugt mindestens 50%.

Der Anteil an Insulin-produzierenden Zellen kann weiterhin durch eine Selektion von Nestin-positiven Zellen erhöht werden. Diese Selektion umfasst bevorzugt  
30 den Transfer von Embryoid-Körpern, die z.B. durch das Verfahren mit hängenden Tropfen erhalten wurden, in eine Suspensionskultur und ein

nachfolgendes Plattieren oder/und nochmaliges Plattieren auf ein geeignetes Medium, z.B. auf eine mit Poly-L-Ornithin/Laminin beschichtete Platte. Das Nestin-Selektionsverfahren kann zu einem weiteren Anstieg des Anteils an Insulin-produzierenden Zellen führen, z.B. zu einem Anteil von 70% oder mehr.

5

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung können differenzierte Insulin-produzierende Zellen unter Verwendung eines Verfahrens zur Selektion von Insulin-sekretierenden Zellklonen aus ES-Zellen isoliert und gereinigt werden, durch Transfizieren von Zellen mit einem Plasmid, das die Expression eines

10 Neomycin-, Hygromycin- oder Puromycin-Resistenzgens unter der Kontrolle der regulatorischen Region des humanen Insulingens erlaubt. Die Zellen können auch unter Verwendung einer Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierung (FACS) nach einer Färbung mit dem Hoechst-Farbstoff 33342 (Goodell *et al.* (1996) J. Exp. Med. 183:1797-1806) sortiert werden. Weitere Modifikationen der oben

15 erwähnten Ausführungsform der Erfindung können vom Fachmann leicht, ohne unangemessenes Experimentieren, anhand dieser Offenbarung erdacht werden.

Eine zusätzliche Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zur Behandlung von Diabetes, worin einem diabetischen Patienten

20 zwischen 300 und 100000 äquivalent differenzierte Insulin-produzierende Zellen pro Kilogramm Körpergewicht intraportal mittels eines percutanen, transhepatischen Zugangs unter Verwendung einer Lokalanästhesie verabreicht werden. Solche chirurgischen Techniken sind im Fachgebiet gut bekannt und können ohne jedes unangemessene Experimentieren angewendet werden,

25 siehe Pyzdrowski *et al.*, „Preserved insulin secretion and insulin independence in recipients of islet autografts“ New England J. Medicine 327:220-226, 1992; Hering *et al.*, „New protocol toward prevention of early human islet allograft failure“ Transplantation Proc. 26:570-571, 1993; Shapiro *et al.*, „Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a

30 glucocorticoid-free immunosuppressive regimen“, New England J. Medicine 343:230-238, 2000. Weiterhin kann bei der Transplantation von



differenzierten Insulin-produzierenden Zellen auch eine Einkapselungs-Technik verwendet werden, wie von Lanza *et al.*, „Encapsulated cell technology“, Nature Biotech 14:1107-1111, 1996, beschrieben wird.

- 5 Weiterhin betrifft die Erfindung eine Zellzusammensetzung, umfassend differenzierte Stammzellen, die eine Insulinproduktion zeigen, z.B. eine Insulin-produzierende Zelllinie, erhältlich durch das oben beschriebene Verfahren. Die Insulin-produzierenden Zellen können eine stabile oder eine transiente Expression mindestens eines Gens, das in die  $\beta$ - Zelldifferenzierung involviert
- 10 ist, zeigen, insbesondere eines Gens, wie es oben beschrieben wird. Die Zellen sind bevorzugt humane Zellen, die von humanen Stammzellen abstammen. Für therapeutische Anwendungen ist die Erzeugung von autologen humanen Zellen aus adulten Stammzellen eines Patienten besonders bevorzugt.
- 15 Die Insulin-produzierenden Zellen der Erfindung zeigen Charakteristika, die natürlich vorkommenden  $\beta$ -Zellen stark ähneln. Insbesondere ist das Verhältnis von Insulin-produzierenden Zellen zu Glucagon-produzierenden Zellen hoch. Nach 15 Tagen Differenzierung ist dieses Verhältnis bevorzugt mindestens 2:1, und mehr bevorzugt mindestens 5:1. Weiterhin sind die Zellen der
- 20 Erfindung in der Lage, schnell auf Glucose zu reagieren. Nach Zugabe von 27,7 mM Glucose wird die Insulinproduktion in den Zellen der Erfindung mindestens um einen Faktor von 2 verstärkt, bevorzugt um einen Faktor von mindestens 3. Weiterhin sind die Zellen der Erfindung nach einer Transplantation in Mäuse in der Lage, Blutglucose-Spiegel zu normalisieren.
- 25 Die Zellzusammensetzung der Erfindung ist bevorzugt eine pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend die Zellen, zusammen mit pharmakologisch geeigneten Trägern, Verdünnungsmitteln oder/und Adjuvantien. Die pharmazeutische Zusammensetzung wird bevorzugt zur Behandlung von
- 30 Diabetes verwendet. Die Verabreichung erfolgt bevorzugt durch eine Transplantation, wie oben beschrieben.

13.06.03

17

DE 102 90 025 T1

In einer weiteren Ausführungsform ermöglicht die vorliegende Erfindung die Erzeugung von Zellen zur Identifizierung oder/und Charakterisierung von Verbindungen, die die Beta-Zelldifferenzierung, die Insulinsekretion oder die Reaktion auf Glucose stimulieren. Dieses Verfahren ist besonders geeignet zum *in vivo* Testen von diagnostischen Applikationen und zur Medikamenten-Entwicklung oder zum Medikamenten-Screening. Die interessierende Verbindung wird zu differenzierten und nicht differenzierten Insulin-produzierenden Zellen zugegeben, die in geeigneten Kultursystemen, beispielsweise in 96- oder 384-Well-Platten wachsen. Die Insulin-Spiegel in den behandelten Zellen können mittels eines Enzym-Immunassays (ELISA, „Enzyme Linked Immunosorbent Assay“) oder eines Radioimmunassays (RIA) quantifiziert werden. Unter Verwendung dieses Verfahrens kann eine große Zahl von Verbindungen durchsucht werden, und Verbindungen, die die Beta-Zelldifferenzierung induzieren und die Insulin-Sekretion erhöhen, können einfach identifiziert werden.

Bevorzugte Ausführungsformen für Hochdurchsatz-Screening- und Medium-Durchsatz-Validierungs-Verfahren sind in Figur 9 beschrieben. In einem Hochdurchsatz-Screening-Verfahren werden die Zellen mit einem DNA-Konstrukt transfiziert, z.B. einem viralen oder nicht viralen Vektor, der ein Reportergen enthält, z.B. das lacZ-Gen oder das GFP-Gen, unter der regulatorischen Kontrolle eines Promoters eines Gens, das in die  $\beta$ -Zelldifferenzierung involviert ist, z.B. einen Promoter eines Gens, wie oben beschrieben, bevorzugt einen Pax4-Promoter. Die transfizierten Zellen werden in Aliquots aufgeteilt, und jedes Aliquot wird mit einer Testsubstanz in Kontakt gebracht, z.B. Kandidat 1, Kandidat 2 und Kandidat 3. Die Aktivität des Reportergens entspricht der Fähigkeit der Testverbindung, die  $\beta$ -Zelldifferenzierung zu induzieren.

13.05.03

DE 102 90 025 T1

In einer weiteren Ausführungsform (die mit dem oben beschriebenen Hochdurchsatz-Screening kombiniert werden kann) wird eine Medium-Durchsatz-Validierung durchgeführt. Darin wird die Testverbindung zu kultivierten Stammzellen zugegeben, und die Insulinproduktion wird bestimmt.

- 5 Nachfolgend einem ersten Hochdurchsatz-Assay, so wie dem zellbasierenden Assay, der oben skizziert wird, worin z.B. ein Pax4-Promoter als Marker für die Beta-Zellregeneration verwendet wird, wird die Aktivität der Kandidatenmoleküle, die Beta-Zelldifferenzierung zu induzieren, in einem Validierungs-Assay getestet, der die Zugabe der Verbindungen zu dem Kulturmedium der
- 10 Embryoid-Körper umfasst. Die Differenzierung in Insulin-produzierende Zellen wird dann bewertet, z.B. durch Vergleich mit Wildtyp- oder/und Pax4-exprimierenden ES-Zellen, um die Wirksamkeit einer Verbindung einzuschätzen.

15 **Kurze Beschreibung der Figuren**

**Figur 1:** Expressionsvektoren, die das Pdx1-, Pax4-, Pax6- und ngn3-Gen enthalten.

- 20 Die Pdx1-, Pax4-, Pax6- und ngn3- (SEQ ID Nr. 1,2,3,4) cDNAs wurden in den Expressionsvektor pACCMV.pLpA insetiert, der schon von Becker *et al.* (Becker *et al.* (1994) Meth. Cell Biol. 43:161-189) beschrieben wurde. Kurz, es wurde ein Kpn I-Bam HI-Fragment, das die Pdx1-cDNA (SEQ ID Nr. 1) enthielt, in die Kpn I-Bam HI-Stellen von pACCMV.pLpA eingeführt, wobei das
- 25 Pdx1-Gen unter die Kontrolle des Cytomegalievirus (CMVp)-Promoters gestellt wurde. Ebenso wurde ein Bam HI-Hind III-Fragment, das die Pax4-cDNA (SEQ ID Nr. 2) enthielt, in die Bam HI-Hind III-Stellen von pACCMV.pLpA eingeführt, wobei das Pax4-Gen unter die Kontrolle des CMV-Promoters gestellt wurde; ein Bam HI-Hind III-Fragment, das die Pax6-cDNA (SEQ ID Nr. 3) enthielt,
- 30 wurde in die Bam HI-Hind III-Stellen von pACCMV.pLpA eingeführt, wobei das Pax6-Gen unter die Kontrolle des CMV-Promoters gestellt wurde; und ein Bam

HI-Xba I-Fragment, das die ngn3-cDNA (SEQ ID Nr. 4) enthielt, wurde in die Bam HI-Xba I-Stellen von pACCMV.pLpA eingeführt, wobei das ngn3-Gen unter die Kontrolle des CMV-Promoters gestellt wurde. Abkürzungen: B, Bam HI; H, Hind III; K, Kpn I; X, Xba I; Ad 5, Adenovirus Typ 5.

5

## Figur 2. Differenzierung von ES-Zellen in Insulin-produzierende Zellen

10 Wildtyp- und Pdx1-exprimierende embryonale Stamm (ES)-zellen wurden als Embryoid-Körper (EB, Ebs) mittels eines Verfahrens mit hängenden Tropfen kultiviert. Differenzierungs- und terminales Differenzierungsmedium wurden beim Plattieren der EBs angewendet.

## 15 Figur 3. Menge an Hormon-produzierenden Zellen in Pdx1 + differenzierten ES-Zellen

Immunfluoreszenz-Überwachung von positiven Zellen hinsichtlich Insulin, Glucagon, pankreatischem Polypeptid (PP) und Somatostatin nach dem Plattieren der Pdx1 + Embryoid-Körpern, die in normalem Kulturmedium und Differenzierungsmedium kultiviert wurden. Die Ergebnisse sind in willkürlichen Einheiten über die Zeit angegeben, und stellen die durchschnittliche Anzahl der Hormon-produzierenden Zellen in definierten Bereichen der Kulturschalen dar. Die Anzahl der Hormon-produzierenden Zellen (z.B. Insulin, Glucagon, PP und Somatostatin) ist höher, wenn Embryoid-Körper in Differenzierungsmedium und terminalem Differenzierungsmedium kultiviert werden.

## Figur 4. Expression von Pankreas-spezifischen Genen nach Differenzierung von Wildtyp-, Pdx1<sup>+</sup>- und Pax4<sup>+</sup>-ES-Zellen in Insulin-produzierende Zellen.

30 mRNA-Niveaus von Pankreas-spezifischen Genen folgend einer Embryoid-Körperbildung mittels des Verfahrens mit hängenden Tropfen und Plattieren in

Differenzierungsmedium. Insulin- und Glut2-Niveaus sind in Pdx1<sup>+</sup>- und in Pax4<sup>+</sup>-ES-Zellen höher als in Wildtyp-ES-Zellen, was anzeigt, dass die Differenzierung effizienter ist, wenn ein pankreatisches Entwicklungskontrollgen aktiviert wird.

5

**Figur 5.** Differenzierung von Maus-ES-Zellen in Insulin-produzierende Zellen.

Der Anteil an Insulin-produzierenden Zellen in Wildtyp-Zellen (R1) und in Pdx1- und Pax4-exprimierenden Zellen wurde 5, 6, 10 und 15 Tage nach dem Plattieren bestimmt.

10

**Figur 6.** Insulin-produzierende Zellen gegen Glucagon-produzierende Zellen.

Die Expression von Insulin und Glucagon in Wildtyp-ES-Zellen, Pdx1-exprimierenden Zellen und Pax4-exprimierenden Zellen wurde 5, 10 oder 15 Tage nach dem Plattieren bestimmt.

15

**Figur 7.** Glucose-Reaktion von Insulin-Zellen, die von Pax4-ES-Zellen abgeleitet sind.

20

Die Insulin-Sekretion von Wildtyp- (R1) und von Pax4-ES abgeleiteten Insulin-produzierenden Zellen wurde in Abwesenheit von Glucose und 15 Minuten nach Stimulation mit 27,7 mM Glucose bestimmt.

25

**Figur 8.** Regulierung von Blutglucose-Spiegeln in diabetischen Mäusen.

Es wurde der Blutglucose-Spiegel von diabetischen Kontrollmäusen (STZ-Kontrolle) und diabetischen Mäusen, die ein Transplantat aus Insulin-produzierenden Zellen erhielten, die von Pax4-ES-Zellen abgeleitet waren, bestimmt.

30

Figur 9. Medikament-Screening-Strategien.

Es werden ein Hochdurchsatz-Screening- und ein Medium-Durchsatz-Validierungs-Verfahren für drei Testverbindungen gezeigt. Ein anfängliches  
5 Hochdurchsatz-Screening wird unter Verwendung von Pax-Promotoren als Reporter für die Beta-Zelldifferenzierung in einem Zellassay durchgeführt. Postive Kandidaten werden dann in einem Medium-Durchsatz-Assay, der Embryoid-Körper einbezieht, validiert. Die Verbindungen werden in verschiedenen Kulturstadien auf deren Potential getestet, die Bildung von  
10 Insulin-produzierenden Zellen zu induzieren.

Figur 10. Verfahren der Differenzierung von ES-Zellen in Insulin-produzierende Zellen unter Verwendung von Kulturbedingungen, die die Bildung von Nestin-positiven Zellen begünstigen.

15

Figur 11. Differenzierung von Nestin-positiven Maus-ES-Zellen in Insulin-produzierende Zellen.

## 20 BEISPIELE

Ein besseres Verständnis der vorliegenden Erfindung und ihrer vielen Vorteile wird sich aus den folgenden Beispielen ergeben, die zur Veranschaulichung dienen.

25

**Beispiel 1:** Erzeugung von ES-Zellen, die das Pdx1- oder Pax6-Gen exprimieren.

Die Maus-R1-ES-Zellen (Nagy *et al.* (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:8424-8) wurden mit dem Pax6- oder dem Pdx1-Gen unter der Kontrolle des  
30 CMV-Promoters (siehe Figur 1) und mit dem Neomycin-Resistenzgen unter der Kontrolle des Phosphoglycerat-Kinase I-Promoters (pGK-1) elektroporiert. Die

ES-Zellen werden in Dulbecco's modifiziertem Eagle-Medium (DMEM, Life Technologies), das 4,5 g/l Glucose,  $10^{-4}$  M Beta-Mercaptoethanol, 2 nM Glutamin, 1% nicht essentielle Aminosäuren, 1 nM Na-Pyruvat, 15% FCS und 500 U/ml des Leukämie-inhibitorischen Faktors (LIF, „Leukemia Inhibitory Factor“), enthielt. Kurz, es wurden ungefähr  $10^7$  ES-Zellen in 0,8 ml Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS), die 25  $\mu\text{g/ml}$  des linearisierten Expressionsvektors enthielt, resuspendiert, und mit einem Impuls von 500  $\mu\text{F}$  und 250 Volt bei Raumtemperatur unter Verwendung eines Gene Pulser Elektroporations-Apparats (BioRad) elektroporiert. Fünf Minuten nach der Elektroporation wurden die ES-Zellen auf 8,5 cm Petrischalen ausplattiert, die fibroblastische Versorgungs-Zellen enthielten, die zuvor durch eine Behandlung für 3 Stunden mit 100  $\mu\text{g/ml}$  Mitomycin C inaktiviert wurden. Einen Tag nach der Elektroporation wird das Kulturmedium gegen ein Medium, das 450  $\mu\text{g/ml}$  G418 enthält, gewechselt. Resistente Klone wurden separat isoliert und 14 Tage ab Anwendung des Selektionsmediums kultiviert. Die Zellen werden immer bei  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  kultiviert.

#### Beispiel 2: Differenzierung von ES-Zellen in Insulin-produzierende Zellen.

Die ES-Zelllinie R1 (Wildtyp, wt) und ES-Zellen, die konstitutiv Pdx1 (Pdx1 +) exprimieren, wurden als Embryoid-Körper (EB, EBs) mittels des Verfahrens mit hängenden Tropfen kultiviert (Figur 2). Kurz, es wurden ungefähr 600 Zellen in Tropfen von 20  $\mu\text{l}$  Medium platziert, das zusammengesetzt war aus Iscove's modifiziertem Dulbecco-Medium (IMDM, Gibco), ergänzt mit 20% FCS, L-Glutamin, nicht essentiellen Aminosäuren und Alpha-Monothioglycerol (Sigma, Steinheim, Deutschland; Endkonzentration 450  $\mu\text{M}$ ). Die Tropfen wurden auf den Deckeln von Petrischalen platziert, die mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) gefüllt waren. Die Bildung von EBs wurde in den Kulturen mit hängenden Tropfen für 2 Tage ermöglicht, die Ebs wurden dann für drei Tage in Suspensionskulturen in bakteriologische Petrischalen (Greiner, Deutschland) transferiert. An Tag 5 wurden die EBs separat auf Gelatine-beschichtete 24-

Well-Platten ausplattiert, die ein Differenzierungsmedium enthielten, das auf Basis von Iscove modifiziertem Dulbecco-Medium (IMDM, Gibco) hergestellt war, ergänzt mit 20% FCS, 2 mM L-Glutamin, 1:100 nicht essentielle Aminosäuren, 450  $\mu$ M  $\alpha$ -Monothioglycerol (Sigma), 10 ng/ml epithelialen Wachstumsfaktor (EGF, „Epithelial Growth Factor“, R&D Research), 2 ng/ml basalen Fibroblasten-Wachstumsfaktor (bFGF, „Basic Fibroblast Growth Factor“, R&D Research), 20 nM Progesteron (R&D Research), 100 ng/ml humanes Wachstumshormon (HGH, „Human Growth Hormone“, R&D Systems) und 5 nM Follistatin (R&D Systems) oder/und 2 nM humanes Activin A (R&D Systems). Die Zellen wurden für 15 bis 40 Tage in dem Differenzierungsmedium kultiviert. Um die Differenzierungskapazität zu verstärken, kann ein terminales Differenzierungsmedium in den Stadien zwischen 5 und 20 Tage nach EB-Plattierung angewendet werden.

### 15 Beispiel 3: Hormonale Expression in differenzierten ES-Zellen.

Die Expression von Insulin, Glucagon, Somatostatin und pankreatischem Polypeptid (PP) wurde mittels Immunfluoreszenz in differenzierten wt- und Pdx1+-ES-Zellen überprüft. Die Immunfluoreszenz wurde gemäß den Standardprotokollen durchgeführt (siehe Wobus *et al.*: „In Vitro Differentiation of Embryonic Stem Cells and Analysis of Cellular Phenotypes, In: Tymms, M.J. und Kola, I. (Eds.) Gene Knockout Protocols, Vol. 158, Methods in Molecular Biology“, Humana Press, Totowa, New Jersey, 2001). Kurz, es wurden differenzierte wt- oder Pdx1+-ES-Zellen auf Deckgläschen angezogen und zweimal mit PBS gewaschen und mit Methanol:Aceton 7:3 für 10 Minuten bei -20°C fixiert. Die folgenden Antikörper wurden verwendet: Maus Anti-Insulin (Sigma-Aldrich Co.), Kaninchen Anti-Glucagon (Dako Corporation), Kaninchen Anti-Somatostatin (Dako Corporation), Kaninchen Anti-PP (Dako Corporation) wurden als primärer Antikörper verwendet, während Fluorescein (DTAF)-konjugierte Ziege-Anti-Maus-IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories) und Cy<sup>3</sup><sup>TM</sup>-konjugierte Ziege-Anti-Kaninchen-IgG (Jackson ImmunoResearch



Laboratories) als sekundärer Antikörper verwendet wurden. In dieser Studie wurde eine doppelte Immunfärbung durchgeführt, und die folgenden Paare von Antikörpern wurden verwendet: Anti-Insulin und Anti-Glucagon; Anti-Insulin und Anti-Somatostatin; Anti-Insulin und Anti-PP. Die Zellen wurden mit einem  
5 Fluoreszenz-Mikroskop Optiphot-2 (Nikon) und einem confokalen Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM) LSM-410 (Carl Zeiss) analysiert. Differenzierte wt-ES-Zellen coexprimieren Insulin, Glucagon, PP und Somatostatin, was darauf hindeutet, dass die Zellen keine Reifung in Zellen durchgemacht haben, die einzelne Hormone produzieren. Aber differenzierte Pdx1<sup>+</sup>-Zellen  
10 exprimieren entweder Insulin oder Glucagon, aber kaum beide Hormone zur gleichen Zeit, was zeigt, dass solche Zellen eine Reifung in Zellen erreichen, die einzelne Hormone produzieren. Die Anzahl der Hormon-produzierenden Zellen ist höher, wenn Pdx1<sup>+</sup>-ES-Zellen in einem Differenzierungsmedium kultiviert werden (siehe Figur 3), was veranschaulicht, dass eine  
15 Differenzierung in Insulin-produzierende Zellen effizienter ist, wenn ein pankreatisches Entwicklungs-Kontrollgen in einer Stammzelle (z.B. ES) exprimiert wird, und wenn solche Zellen in einem Differenzierungsmedium kultiviert werden.

20 **Beispiel 4: Expression von Pankreas-spezifischen Genen nach Differenzierung von ES-Zellen in Insulin-produzierende Zellen.**

Die Expressions-Niveaus von Pankreas-spezifischen Genen wurden mittels einer semi-quantitativen RT-PCR-Analyse gemessen. Differenzierte Wildtyp-,  
25 Pdx-1<sup>+</sup>- und Pax4<sup>+</sup>-Zellen, die nach der Embryoid-Körperbildung (5d) und 2, 7, 10, 15, 21 und 24 Tage nach dem Plattieren (5+2d, +7d, +10d, +15d, +21d, +24d) gesammelt wurden, wurden in Lysepuffer (4 M Guanidinium-thiocyanat, 25 mM Natriumcitrat, pH 7; 0,5% Sarcosyl, 0,1 M Beta-Mercaptoethanol) suspendiert. Die Gesamt-RNA wurde mittels der von  
30 Chomczynski und Sacchi (Chomczynski und Sacchi (1987) Anal. Biochem. 162:156-159) beschriebenen Einzelschritt-Extraktionsmethode isoliert. mRNA

wurde unter Verwendung von PolyT-Schwanz Oligo d(T)<sub>18</sub>-Primer (Perkin Elmer) revers transkribiert, und die resultierende cDNA wurde unter Verwendung von Oligonukleotid-Primern amplifiziert, die komplementär zu und identisch mit den Transkripten der folgenden Gene waren: GLUT2 (SEQ ID Nr. 9 und 10; Annealing-Temperatur 60°C für 40 Zyklen, erwartete Fragmentgröße 556 bp), Insulin (SEQ ID Nr. 11 und 12; Annealing-Temperatur 60°C für 40 Zyklen, erwartete Fragmentgröße 340 bp), ngn3 (SEQ ID Nr. 13 und 14; Annealing-Temperatur 60°C für 40 Zyklen, erwartete Fragmentgröße 514 bp), Pdx-1 (SEQ ID Nr. 15 und 16; Annealing-Temperatur 60°C für 45 Zyklen, erwartete Fragmentgröße 230 bp) und Isl1 (SEQ ID Nr. 17 und 18; Annealing-Temperatur 60°C für 40 Zyklen, erwartete Fragmentgröße 514 bp). Das Housekeeping-Gen Beta-Tubulin (SEQ ID Nr. 19 und 20; Annealing-Temperatur: 60°C für 28 Zyklen, erwartete Fragmentgröße 317 bp) wurde als interner Standard verwendet. Die reverse Transkription (RT) wurde mit MuLV reverse Transkriptase (Perkin Elmer) durchgeführt. Die Multiplex-PCRs wurden unter Verwendung von AmpliTaq DNA-Polymerase (Perkin Elmer) durchgeführt, wie in Wobus *et al.*, 1997, beschrieben. Kurz, es wurden RT-Reaktionen (20 µl) mit der MuLV reversen Transkriptase durchgeführt. Separate PCRs unter Verwendung von Primern der analysierten Gene oder Primer des Housekeeping-Gens Beta-Tubulin wurden mit 3 µl der RT-Produkte durchgeführt.

Die mRNA-Niveaus der Gene, die für Pax4 und Insulin codieren, wurden unter Verwendung des „DynaBeads mRNA DIRECT Mikro-Kits“ (Dyna) gemäß den Anweisungen des Herstellers analysiert.

Ein Drittel jeder PCR-Reaktion wurde mittels Elektrophorese auf 2%igen Agarose-Gelen, die 0,35 µg/ml Ethidiumbromid enthielten, aufgetrennt. Die Gele wurden mit UV-Licht beleuchtet, und die Ethidiumbromid-Fluoreszenzsignale der Gele wurden mit dem E.A.S.Y.-System (Herolab) gespeichert und mit der TINA2,08e-Software (Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH) analysiert.

Die Intensität der Ethidiumbromid-Fluoreszenzsignale wurde aus der Kurve unter jedem Peak bestimmt, und die Daten der Zielgene wurden als prozentuale Änderung im Bezug auf die Expression des Housekeeping-Gens Beta-Tubulin aufgetragen.

5

Die Ergebnisse zeigen, dass Marker für eine Beta-Zelldifferenzierungsfunktion in differenzierten Pdx1<sup>+</sup>- und Pax4<sup>+</sup>- ES-Zellen auf einem höheren Niveau exprimiert wurden, als in differenzierten Wildtyp-ES-Zellen, was zeigt, dass eine Aktivierung eines pankreatischen Entwicklungs-Kontrollgens die Differenzierung effizienter werden lässt, als bei Wildtyp-ES-Zellen (Figur 4). Die Expression von GLUT2 in differenzierten Stammzellen deutet darauf hin, dass Hormon-produzierende Zellen in der Lage sind, auf Glucose zu reagieren. Außerdem werden Gene, die in eine frühe endodermale/pankreatische Vorläufer-Zellspezifizierung involviert sind, so wie ngn3 und Isl1, in Pdx-1<sup>+</sup>- und Pax4<sup>+</sup>-ES-Zellen herunter reguliert sind, was mit *in vivo* Daten übereinstimmt, nach denen solche Zellen zu Zellen gereift sind, die ein einzelnes Hormon produzieren.

10

15

#### Beispiel 5: Hormonale Expression von differenzierten ES-Zellen, die Pdx1 und Pax4 exprimieren

20

Um das Potential einer pankreatischen Entwicklungskontrolle zu studieren, eine Beta-Zelldifferenzierung *in vitro* zu induzieren, haben wir stabile embryonale Stammzellen (ES) der Maus hergestellt, die das Pax4- oder Pdx1-Gen unter der Kontrolle der frühen Cytomegalievirus (CMV) Promoter/Enhancer-Region (siehe Figur 1a, b) exprimieren. Die CMV-Pax4- und CMV-Pdx1-Transgene wurden in ES-Zellen mittels Elektroporation eingebracht, ein Verfahren, das im Fachgebiet gut bekannt ist, siehe zum Beispiel Joyner, „Gene Targeting: A Practical Approach“, Oxford University Press, New York, 1993; Mansouri „Gene Targeting by Homologous Recombination in Embryonic Stem Cell, Cell Biology: A Laboratory Handbook“, zweite Auflage, Academic Press, 1998).

25

30

Pax4-, Pdx1- und Wildtyp-ES-Zellen wurden dann in hängenden Tropfen oder Spinnerkulturen kultiviert, um die Bildung von Embryoid-Körpern zu ermöglichen. Die Embryoid-Körper wurden nachfolgend ausplattiert, und in einem Differenzierungsmedium kultiviert, das verschiedene Wachstumsfaktoren enthielt. Unter solchen Bedingungen können Insulin-produzierende Zellen in Pdx1- und Pax4-exprimierenden Zellen sechs Tage nach dem Plattieren (Figur 5) detektiert werden. Im Vergleich dazu enthalten Wildtyp-ES-Zellen im gleichen Stadium keine Insulin-produzierenden Zellen. Zehn Tage nach dem Plattieren waren 12% der Pdx1- und Pax4-exprimierenden Zellen positiv hinsichtlich Insulin, während die ersten Insulin-produzierenden Zellen in Wildtyp-ES-Zellen beobachtet wurden. An Tag 15 nach dem Plattieren waren bis zu 60% der Pax4-ES-Zellen positiv hinsichtlich Insulin, verglichen mit 22% der Pdx1-ES-Zellen und 6% der Wildtyp-ES-Zellen. Diese Daten zeigen, dass Pax4, und in gewissem Ausmaß Pdx1, verglichen mit Wildtyp-ES-Zellen die Differenzierung von ES-Zellen in Insulin-produzierende Zellen deutlich fördern und verstärken kann.

Die Expression von Pax4 beeinflusst auch den Differenzierungsstatus der Insulin-produzierenden Zelle. Während der Embryogenese coexprimieren die ersten Hormon-produzierenden Zellen, die im sich entwickelnden Pankreas auftauchen, sowohl Insulin als auch Glucagon. Diese Zellen differenzieren nachfolgend und reifen zu Zellen, die ein einzelnes Hormon produzieren. In einer ähnlichen Art und Weise coexprimieren alle Insulin-produzierenden Zellen, die aus Wildtyp-ES-Zellen erhalten werden, auch Glucagon, was darauf hindeutet, dass eine Differenzierung der Zellen in einem nicht ausgereiften Stadium zum Stillstand kommt (Figur 6). Solche Zellen besitzen höchstwahrscheinlich einen geringen therapeutischen Wert, da Insulin und Glucagon einen entgegengesetzten Effekt auf Blutglucose-Spiegel in einem Organismus besitzen. Aber in Pax4-ES-Zellen werden Zellen, die einzig Insulin produzieren, in wesentlichen Mengen gebildet (Figur 6). Insulin- und Glucagon-coexprimierende Zellen werden in geringen Zahlen entdeckt, und

repräsentieren höchstwahrscheinlich einen laufenden Differenzierungsprozess innerhalb der Kulturen. Diese Beobachtung zeigt, dass Pax4 die Differenzierung von Insulin-produzierenden Zellen, die reifer sind, als die Zellen, die in Wildtyp-ES-Zellen beobachtet werden, induziert und verstärkt.

5

**Beispiel 6:** Funktionelle Charakterisierung der differenzierten Insulin-produzierenden Zellen.

Eine wichtige Eigenschaft von Beta-Zellen ist eine Insulinsekretion, die auf  
10 Glucose reagiert. Um zu testen, ob die von Pax4 abgeleiteten Insulin-  
produzierenden Zellen diese Glucosereaktions-Eigenschaft besaßen, wurde mit  
den differenzierten Zellen *in vitro* ein Glucosereaktions-Assay durchgeführt.  
Kurz, es wurden zwischen 10 und 14 Embryoid-Körper in 3 cm Petrischalen  
kultiviert, die das oben erwähnte Differenzierungsmedium enthielten. Am Tag  
15 des Assays wurde das Differenzierungsmedium entfernt, und die Zellen  
wurden 3 Mal mit einem Krebs-Ringer-Bicarbonat-Hepes-Puffer (KRBH; 118  
mM NaCl, 4,7 KCl, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1,2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,2 mM MgSO<sub>4</sub>, 24,6  
NaHCO<sub>3</sub>, 10 mM Hepes, 2 mg/ml BSA) gewaschen. Die Zellen wurden dann  
für 45 min bei 37°C in 750 µl KRBH inkubiert. Das KRBH wurde dann zur  
20 Messung der basalen Insulinsekretion aufbewahrt, und 750 µl KRBH,  
enthaltend 27,7 mM Glucose, wurden zu den Zellen zugegeben. Nach 15  
Minuten Inkubation bei 37°C wurde das KRBH zur Messung der Glucose-  
induzierten Insulinsekretion von den Zellen entfernt. Die Insulin-Spiegel wurden  
bestimmt durch einen Enzymimmunassay (ELISA, „Enzyme-Linked  
25 Immunosorbent Assay“) für Mäuseinsulin (Mercodia), durchgeführt gemäß den  
Empfehlungen des Herstellers. Ein alternatives Medium für eine richtige Insulin-  
Abgabe basiert auf DMEM mit einer Glucosekonzentration von 1 g/l (Gibco),  
ergänzt mit nicht essentiellen Aminosäuren (Gibco, Stammlösung 1:100) und  
zusätzlichen Faktoren, die oben erwähnt sind. Solch ein Medium kann von 1  
30 bis 6 Tage vor Gebrauch der Zellen angewendet werden.

Eine basale Insulinsekretion wird beobachtet, wenn sowohl Wildtyp- als auch von Pax4-ES abgeleitete Insulin-produzierende Zellen in Abwesenheit von Glucose kultiviert werden (Figur 7). Aber nur die von Pax4-ES abgeleiteten Insulin-produzierenden Zellen reagieren auf eine Glucosestimulierung. In Gegenwart von Glucose wird in von Pax4-ES abgeleiteten Insulin-produzierenden Zellen ein fünffacher Anstieg der Insulinsekretion gesehen. Von Wildtyp-ES abgeleitete Insulin-produzierende Zellen reagieren nicht auf Glucose.

10 **Beispiel 7:** Transplantation der von Pax4-ES abgeleiteten Insulin-produzierenden Zellen in diabetische STZ-Mäuse.

Das therapeutische Potential der von Pax4-ES abgeleiteten Insulin-produzierenden Zellen, Diabetes zu bessern oder zu heilen, wurde durch Transplantation der Zellen in Mäuse mit einer durch Streptozotocin induzierten Diabetes untersucht. Streptozotocin ist ein Antibiotikum, welches auf Beta-Zellen cytotoxisch wirkt, wenn es in einer bestimmten Dosis verabreicht wird (siehe Rodrigues *et al.*: „Streptozotocin-induced Diabetes“, in McNeill (Ed.) „Experimental Models of Diabetes“, CRC Press LLC, 1999). Seine Wirkung ist schnell, wobei ein Tier innerhalb von 48 Stunden schwer diabetisch gemacht wird.

Nicht hungernde, männliche BalbC-Mäuse, wurden mit 170 mg/Kg Körpergewicht STZ behandelt. Unter solchen Bedingungen entwickelten 17 Kontroll-Mäuse 6 Tage nach der STZ-Behandlung eine Hyperglykämie. Die Mäuse wurden als diabetisch angesehen, wenn sie für mehr als 3 aufeinander folgende Tage einen Blutglucose-Spiegel über 10 mMol/l besaßen. Eine Maus reagierte nicht auf die STZ-Behandlung. Erhöhte Blutglucose-Spiegel variierten deutlich zwischen den Tieren und zwischen den Tagen. Dies lässt auf Diabetes schließen, da die Tiere ihre Blutglucose nicht regulieren können. Zellen wurden unter die Nierenkapsel und in die Milz von Tieren transplantiert. Kurz, die

Mäuse wurden durch eine intraperitoneale Injektion von 15  $\mu$ l/g Körpergewicht Avertin (2,5% Tribromethylalkohol:tertiärer Amylalkohol) anästhesiert. Die Niere und die Milz wurden durch einen Lumbalschnitt freigelegt, und die Zellen wurden unter Verwendung einer stumpfen 30G-Nadel in jedes Gewebe  
5 transferiert.

Die Transplantation von Zellen unter die Nierenkapsel und in die Milz wurde 24-48 Stunden nach der STZ-Behandlung durchgeführt. 8 Tiere wurden mit zwischen  $1 \times 10^6$  und  $5 \times 10^6$  von Pax4-ES abgeleiteten Insulin-produzierenden  
10 Zellen transplantiert. 4 von 8 transplantierten Mäuse verstarben aufgrund des chirurgischen Eingriffs. Von den 4 Tieren, die überlebten, entwickelte keines eine Diabetes, verglichen mit den STZ-behandelten Kontrolltieren (Figur 8). Die Gegenwart der Insulin-produzierenden Zellen wurde durch eine immun-histologische Analyse des transplantierten Gewebes bestätigt. Diese  
15 Ergebnisse zeigen, dass die transplantierten Zellen die Blutglucose in diabetischen Tieren normalisieren können.

**Beispiel 8:** Differenzierung von ES-Zellen in Insulin-produzierende Zellen unter Verwendung von Kulturbedingungen, die die Bildung von Nestin-positiven  
20 Zellen begünstigen.

Für eine Differenzierung von Nestin-positiven Zellen wurden Maus-ES-Zellen für 2 Tage in hängenden Tropfen (100, 200 oder 400 Zellen/Tropfen) kultiviert, um Embryoid-Körper zu bilden (EBs; Figur 10). Die EBs wurden dann in  
25 bakteriologische Petrischalen (Greiner, Deutschland) transferiert, und für weitere 2 Tage in Iscove's Modifikation von DMEM (IMDM; Gibco), kultiviert, enthaltend 20% FCS und Ergänzungen, wie beschrieben (Rohwedel *et al.* (1998), Dev. Biol. 201(2):167-184), mit der Ausnahme, dass Beta-Mercaptoethanol durch 450 mM Alpha-Monothioglycerol (Sigma, Steinheim,  
30 Deutschland) ersetzt wurde. Zwischen 20 und 30 EBs wurden an Tag 4 auf Gewebekulturschalen (Durchmesser 6 cm) ausplattiert, und für 24 Stunden in

IMDM kultiviert, das mit 20% FCS ergänzt war. Die Selektion von Nestin-positiven Zellen wurde gemäß des Verfahrens ausgeführt, das von Okabe und Kollegen (Okabe *et al.*, 1996, Mech. Dev. 59:89-102) beschrieben wurde, mit folgenden Modifikationen: Nach dem Anheften der EBs (Tag 4+1) wurde das  
5 Medium gegen ein B1-Medium ausgetauscht, das auf Basis des Dulbecco's modifizierten Eagle-Mediums:Nährstoffgemischs F-12 (DMEM/F12, Life Technologies) hergestellt wurde, ergänzt mit 5 mg/ml Insulin, 30 nM Natriumselenit (beide von Sigma), 50 mg/ml Transferrin und 5 mg/ml Fibronectin (beide von Gibco). Das B1-Kulturmedium wurde alle 48 Stunden  
10 wieder aufgefüllt. Nestin-positive Zellen wurden nach einer Kultivierung für 7 Tage (= 4+7d) selektiert. An Tag 4+8 wurden die EBs mit 0,1% Trypsin (Gibco)/0,08% EDTA (Sigma) in Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) (1:1) für 1 Min aufgetrennt, durch Zentrifugation gesammelt, und wieder ausplattiert auf mit Poly-L-Ornithin/Laminin beschichtete Gewebekulturschalen, die ein B2-  
15 Medium enthielten, hergestellt auf Basis von DMEM/F12, ergänzt mit 10% FCS; 20 nM Progesteron; 100 mM Putrescin; 1 mg/ml Laminin (alle von Sigma); 25 mg/ml Insulin; 50 mg/ml Transferrin; 30 nM Natriumselenit; B27-Ergänzung und 10 mM Nicotinamid. Dieses Medium wurde nach 24 Stunden durch ein B2-Medium ohne FCS ersetzt. An Tag 20 nach Plattieren sind  
20 >75% der Pax4-ES-Zellen positiv hinsichtlich Insulin, verglichen mit 20% der Wildtyp-ES-Zellen (Figur 11).

Alle Publikationen und Patente, die in der obigen Beschreibung erwähnt werden, sind hierin als Bezugnahme eingeschlossen. Verschiedene  
25 Modifikationen und Variationen des beschriebenen Verfahrens und Systems der Erfindung werden für Fachleute offensichtlich sein, ohne vom Umfang und Geist der Erfindung abzuweichen. Obwohl die Erfindung in Verbindung mit speziellen bevorzugten Ausführungsformen beschrieben wird, wird klargestellt, dass die beanspruchte Erfindung nicht auf unangemessene Weise auf solche  
30 Ausführungsformen beschränkt wird. Allerdings ist beabsichtigt, dass verschiedene Modifikationen der beschriebenen Ausführungsarten der



13.05.03

DE 102 90 025 T1

32

Erfindung, welche für den Fachmann auf dem Gebiet der Molekularbiologie oder verwandten Gebieten offensichtlich sind, im Umfang der folgenden Ansprüche enthalten sind.

13.06.03

DE 102 90 025 T1

## Sequenzprotokoll

&lt;110&gt; DeveloGen A.G.

<120> Verfahren zur Differenzierung von Stammzellen in  
Insulin-produzierende Zellen

&lt;130&gt; Insulin-ES-Zellen

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;160&gt; 20

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1122

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (54)..(905)

&lt;400&gt; 1

```

cctggcttgt agtcacgacc cggggctgct ggccccaagt gccggctgcc acc atg      56
                                                    Met
                                                    1

```

```

aac agt gag gag cag tac tac gcg gcc aca cag ctc tac aag gac ccg      104
Asn Ser Glu Glu Gln Tyr Tyr Ala Ala Thr Gln Leu Tyr Lys Asp Pro
          5              10              15

```

```

tgc gca ttc cag agg ggc ccg gtg cca gag ttc agc gct aac ccc cct      152
Cys Ala Phe Gln Arg Gly Pro Val Pro Glu Phe Ser Ala Asn Pro Pro
          20              25              30

```

```

gcg tgc ctg tac atg ggc cgc cag ccc cca cct ccg ccg cca ccc cag      200
Ala Cys Leu Tyr Met Gly Arg Gln Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Gln
          35              40              45

```

```

ttt aca agc tgc ctg gga tca ctg gag cag gga agt cct ccg gac atc      248
Phe Thr Ser Ser Leu Gly Ser Leu Glu Gln Gly Ser Pro Pro Asp Ile.
          50              55              60              65

```

```

tcc cca tac gaa gtg ccc ccg ctc gcc tcc gac gac ccg gct ggc gct      296
Ser Pro Tyr Glu Val Pro Pro Leu Ala Ser Asp Asp Pro Ala Gly Ala

```

70

75

80

cac ctc cac cac cac ctt cca gct cag ctc ggg ctc gcc cat cca cct 344  
His Leu His His His Leu Pro Ala Gln Leu Gly Leu Ala His Pro Pro

85

90

95

ccc gga cct ttc ccg aat gga acc gag cct ggg ggc ctg gaa gag ccc 392  
Pro Gly Pro Phe Pro Asn Gly Thr Glu Pro Gly Gly Leu Glu Glu Pro

100

105

110

aac cgc gtc cag ctc cct ttc ccg tgg atg aaa tcc acc aaa gct cac 440  
Asn Arg Val Gln Leu Pro Phe Pro Trp Met Lys Ser Thr Lys Ala His

115

120

125

gcg tgg aaa ggc cag tgg gca gga ggt gct tac aca gcg gaa ccc gag 488  
Ala Trp Lys Gly Gln Trp Ala Gly Gly Ala Tyr Thr Ala Glu Pro Glu

130

135

140

145

gaa aac aag agy acc cgt act gcc tac acc cgg gcg cag ctg ctg gag 536  
Glu Asn Lys Arg Thr Arg Thr Ala Tyr Thr Arg Ala Gln Leu Leu Glu

150

155

160

ctg gag aag gaa ttc tta ttt aac aaa tac atc tcc cgg ccc cgc cgg 584  
Leu Glu Lys Glu Phe Leu Phe Asn Lys Tyr Ile Ser Arg Pro Arg Arg

165

170

175

gtg gag ctg gca gtg atg ttg aac ttg acc gag aga cac atc aaa atc 632  
Val Glu Leu Ala Val Met Leu Asn Leu Thr Glu Arg His Ile Lys Ile

180

185

190

tgg ttc caa aac cgt cgc atg aag tgg aaa aaa gag gaa gat aag aaa 680  
Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys Glu Glu Asp Lys Lys

195

200

205

cgt agt agc ggg acc ccg agt ggg ggc ggt ggg ggc gaa gag ccg gag 728  
Arg Ser Ser Gly Thr Pro Ser Gly Gly Gly Gly Gly Glu Glu Pro Glu

210

215

220

225

caa gat tgt gcg gtg acc tcg ggc gag gag ctg ctg gca gtg cca ccg 776  
Gln Asp Cys Ala Val Thr Ser Gly Glu Glu Leu Leu Ala Val Pro Pro

230

235

240

ctg cca cct ccc gga ggt gcc gtg ccc cca ggc gtc cca gct gca gtc 824  
Leu Pro Pro Pro Gly Gly Ala Val Pro Pro Gly Val Pro Ala Ala Val

245

250

255

cgg gag ggc cta ctg cct tcg ggc ctt agc gtg tcg cca cag ccc tcc 872  
Arg Glu Gly Leu Leu Pro Ser Gly Leu Ser Val Ser Pro Gln Pro Ser

260

265

270

agc atc gcg cca ctg cga ccg cag gaa ccc cgg tgaggacagc agtctgaggg 925  
Ser Ile Ala Pro Leu Arg Pro Gln Glu Pro Arg

275

280

tgagcgggtc tgggacccag agtgtggacg tgggagcggg cagctggata agggaaactta 985

acctaggcgt cgcacaagaa gaaaattctt gagggcacga gagccagttg gatagccgga 1045

gagatgctgc gagcttctgg aaaaacagcc ctgagcttct gaaaactttg aggctgcttc 1105

tgatgccaaag ctaatgg

1122

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 284

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 2

Met Asn Ser Glu Glu Gln Tyr Tyr Ala Ala Thr Gln Leu Tyr Lys Asp

1

5

10

15

Pro Cys Ala Phe Gln Arg Gly Pro Val Pro Glu Phe Ser Ala Asn Pro

20

25

30

Pro Ala Cys Leu Tyr Met Gly Arg Gln Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro

35

40

45

Gln Phe Thr Ser Ser Leu Gly Ser Leu Glu Gln Gly Ser Pro Pro Asp

50

55

60

Ile Ser Pro Tyr Glu Val Pro Pro Leu Ala Ser Asp Asp Pro Ala Gly

65

70

75

80

Ala His Leu His His His Leu Pro Ala Gln Leu Gly Leu Ala His Pro

85

90

95

Pro Pro Gly Pro Phe Pro Asn Gly Thr Glu Pro Gly Gly Leu Gln Glu

100

105

110

Pro Asn Arg Val Gln Leu Pro Phe Pro Trp Met Lys Ser Thr Lys Ala

115

120

125

His Ala Trp Lys Gly Gln Trp Ala Gly Gly Ala Tyr Thr Ala Glu Pro

130

135

140

13.08.03

Glu Glu Asn Lys Arg Thr Arg Thr Ala Tyr Thr Arg Ala Gln Leu Leu  
145 150 155 160

Glu Leu Glu Lys Glu Phe Leu Phe Asn Lys Tyr Ile Ser Arg Pro Arg  
165 170 175

Arg Val Glu Leu Ala Val Met Leu Asn Leu Thr Glu Arg His Ile Lys  
180 185 190

Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys Glu Glu Asp Lys  
195 200 205

Lys Arg Ser Ser Gly Thr Pro Ser Gly Gly Gly Gly Gly Glu Glu Pro  
210 215 220

Glu Gln Asp Cys Ala Val Thr Ser Gly Glu Glu Leu Leu Ala Val Pro  
225 230 235 240

Pro Leu Pro Pro Pro Gly Gly Ala Val Pro Pro Gly Val Pro Ala Ala  
245 250 255

Val Arg Glu Gly Leu Leu Pro Ser Gly Leu Ser Val Ser Pro Gln Pro  
260 265 270

Ser Ser Ile Ala Pro Leu Arg Pro Gln Glu Pro Arg  
275 280

<210> 3

<211> 1084

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (24)..(1019)

<400> 3

tcgcaggagt accagtgtga agc atg cag cag gac gga ctc agc agt gtg aat 53

Met Gln Gln Asp Gly Leu Ser Ser Val Asn

1

5

10

cag cta ggg gga ctc ttt gtg aat ggc cgg ccc ctt cct ctg gac acc 101

Gln Leu Gly Gly Leu Phe Val Asn Gly Arg Pro Leu Pro Leu Asp Thr

-

15

20

25

agg cag cag att gtg cag cta gca ata aga ggg atg cga ccc tgt gac 149

Arg Gln Gln Ile Val Gln Leu Ala Ile Arg Gly Met Arg Pro Cys Asp  
 30 35 40  
 att tca cgg agc ctt aag gta tct aat ggc tgt gtg agc aag atc cta 197  
 Ile Ser Arg Ser Leu Lys Val Ser Asn Gly Cys Val Ser Lys Ile Leu  
 45 50 55  
 gga cgc tac tac cgc aca ggt gtc ttg gaa ccc aag tgt att ggg gga 245  
 Gly Arg Tyr Tyr Arg Thr Gly Val Leu Glu Pro Lys Cys Ile Gly Gly  
 60 65 70  
 agc aaa cca cgt ctg gcc aca cct gct gtg gtg gct cga att gcc cag 293  
 Ser Lys Pro Arg Leu Ala Thr Pro Ala Val Val Ala Arg Ile Ala Gln  
 75 80 85 90  
 cta aag gat gag tac cct gct ctt ttt gcc tgg gag atc caa cac cag 341  
 Leu Lys Asp Glu Tyr Pro Ala Leu Phe Ala Trp Glu Ile Gln His Gln  
 95 100 105  
 ctt tgc act gaa ggg ctt tgt acc cag gac aag gct ccc agt gtg tcc 389  
 Leu Cys Thr Glu Gly Leu Cys Thr Gln Asp Lys Ala Pro Ser Val Ser  
 110 115 120  
 tct atc aat cga gta ctt cgg gca ctt cag gaa gac cag agc ttg cac 437  
 Ser Ile Asn Arg Val Leu Arg Ala Leu Gln Glu Asp Gln Ser Leu His  
 125 130 135  
 tgg act caa ctc aga tca cca gct gtg ttg gct cca gtt ctt ccc agt 485  
 Trp Thr Gln Leu Arg Ser Pro Ala Val Leu Ala Pro Val Leu Pro Ser  
 140 145 150  
 ccc cac agt aac tgt ggg gct ccc cga ggc ccc cac cca gga acc agc 533  
 Pro His Ser Asn Cys Gly Ala Pro Arg Gly Pro His Pro Gly Thr Ser  
 155 160 165 170  
 cac agg aat cgg gct atc ttc tcc ccg gga caa gcc gag gca ctg gag 581  
 His Arg Asn Arg Ala Ile Phe Ser Pro Gly Gln Ala Glu Ala Leu Glu  
 175 180 185  
 aaa gag ttt cag cgt ggg cag tat cca gat tca gtg gcc cgt ggg aag 629  
 Lys Glu Phe Gln Arg Gly Gln Tyr Pro Asp Ser Val Ala Arg Gly Lys  
 190 195 200  
 ctg gct gct gcc acc tct ctg cct gaa gac acg gtg agg gtt tgg ttt 677  
 Leu Ala Ala Ala Thr Ser Leu Pro Glu Asp Thr Val Arg Val Trp Phe  
 205 210 215  
 tct aac aga aga gcc aaa tgg cgc agg caa gag aag ctg aaa tgg gaa 725

Ser Asn Arg Arg Ala Lys Trp Arg Arg Gln Glu Lys Leu Lys Trp Glu  
 220 225 230

gca cag ctg cca ggt gct tcc cag gac ctg acg ata cca aaa aat tct 773  
 Ala Gln Leu Pro Gly Ala Ser Gln Asp Leu Thr Ile Pro Lys Asn Ser  
 235 240 245 250

cca ggg atc atc tct gca cag cag tcc ccc ggc agt gta ccc tca gct 821  
 Pro Gly Ile Ile Ser Ala Gln Gln Ser Pro Gly Ser Val Pro Ser Ala  
 255 260 265

gcc ttg cct gtg ctg gaa cca ttg agt cct tcc ttc tgt cag cta tgc 869  
 Ala Leu Pro Val Leu Glu Pro Leu Ser Pro Ser Phe Cys Gln Leu Cys  
 270 275 280

tgt ggg aca gca cca ggc aga tgt tcc agt gac acc tca tcc cag gcc 917  
 Cys Gly Thr Ala Pro Gly Arg Cys Ser Ser Asp Thr Ser Ser Gln Ala  
 285 290 295

tat ctc caa ccc tac tgg gac tgc caa tcc ctc ctt cct gtg gct tcc 965  
 Tyr Leu Gln Pro Tyr Trp Asp Cys Gln Ser Leu Leu Pro Val Ala Ser  
 300 305 310

tcc tca tat gtg gaa ttt gcc tgc cct gcc tca cca ccc atc ctg tgc 1013  
 Ser Ser Tyr Val Glu Phe Ala Cys Pro Ala Ser Pro Pro Ile Leu Cys  
 315 320 325 330

atc atc tgattggagg cccaggacaa gtgccatcat cccattgctc aaactggcca 1069  
 Ile Ile

taaccgggga attcc 1084

<210> 4  
 <211> 332  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 4  
 Met Gln Gln Asp Gly Leu Ser Ser Val Asn Gln Leu Gly Gly Leu Phe  
 1 5 10 15

Val Asn Gly Arg Pro Leu Pro Leu Asp Thr Arg Gln Gln Ile Val Gln  
 20 25 30

Leu Ala Ile Arg Gly Met Arg Pro Cys Asp Ile Ser Arg Ser Leu Lys  
 35 40 45

Val Ser Asn Gly Cys Val Ser Lys Ile Leu Gly Arg Tyr Tyr Arg Thr  
 50 55 60

Gly Val Leu Glu Pro Lys Cys Ile Gly Gly Ser Lys Pro Arg Leu Ala  
 65 70 75 80

Thr Pro Ala Val Val Ala Arg Ile Ala Gln Leu Lys Asp Glu Tyr Pro  
 85 90 95

Ala Leu Phe Ala Trp Glu Ile Gln His Gln Leu Cys Thr Glu Gly Leu  
 100 105 110

Cys Thr Gln Asp Lys Ala Pro Ser Val Ser Ser Ile Asn Arg Val Leu  
 115 120 125

Arg Ala Leu Gln Glu Asp Gln Ser Leu His Trp Thr Gln Leu Arg Ser  
 130 135 140

Pro Ala Val Leu Ala Pro Val Leu Pro Ser Pro His Ser Asn Cys Gly  
 145 150 155 160

Ala Pro Arg Gly Pro His Pro Gly Thr Ser His Arg Asn Arg Ala Ile  
 165 170 175

Phe Ser Pro Gly Gln Ala Glu Ala Leu Glu Lys Glu Phe Gln Arg Gly  
 180 185 190

Gln Tyr Pro Asp Ser Val Ala Arg Gly Lys Leu Ala Ala Ala Thr Ser  
 195 200 205

Leu Pro Glu Asp Thr Val Arg Val Trp Phe Ser Asn Arg Arg Ala Lys  
 210 215 220

Trp Arg Arg Gln Glu Lys Leu Lys Trp Glu Ala Gln Leu Pro Gly Ala  
 225 230 235 240

Ser Gln Asp Leu Thr Ile Pro Lys Asn Ser Pro Gly Ile Ile Ser Ala  
 245 250 255

Gln Gln Ser Pro Gly Ser Val Pro Ser Ala Ala Leu Pro Val Leu Glu  
 260 265 270

Pro Leu Ser Pro Ser Phe Cys Gln Leu Cys Cys Gly Thr Ala Pro Gly  
 275 280 285

Arg Cys Ser Ser Asp Thr Ser Ser Gln Ala Tyr Leu Gln Pro Tyr Trp  
 290 295 300



<400>	5		
ggatccgag gctgccaaacc agctccagc atg cag aac agt cac agc gga gtg	53		
Met Gln Asn Ser His Ser Gly Val			
1	5		
aat cag ctt ggt ggt gtc ttt gtc aac ggg cgg cca ctg ccg gac tcc	101		
Asn Gln Leu Gly Gly Val Phe Val Asn Gly Arg Pro Leu Pro Asp Ser			
10	15	20	
acc cgg cag aag atc gta gag cta gct cac agc ggg gcc cgg ccg tgc	149		
Thr Arg Gln Lys Ile Val Glu Leu Ala His Ser Gly Ala Arg Pro Cys			
25	30	35	40
gac att tcc cga att ctg cag acc cat gca gat gca aaa gtc cag gtg	197		
Asp Ile Ser Arg Ile Leu Gln Thr His Ala Asp Ala Lys Val Gln Val			
45	50	55	
ctg gac aat gaa aac gta tcc aac ggt tgt gtg agt aaa att ctg ggc	245		
Leu Asp Asn Glu Asn Val Ser Asn Gly Cys Val Ser Lys Ile Leu Gly			
60	65	70	
agg tat tac gag act ggc tcc atc aga ccc agg gca atc gga ggg agt	293		
Arg Tyr Tyr Glu Thr Gly Ser Ile Arg Pro Arg Ala Ile Gly Gly Ser			
75	80	85	
cag cca aga gtg gcg act cca gaa gtt gta agc aaa ata gcc cag tat	341		
Lys Pro Arg Val Ala Thr Pro Glu Val Val Ser Lys Ile Ala Gln Tyr			
90	95	100	
aaa cgg gag tgc cct tcc atc ttt gct tgg gaa atc cga gac aga tta	389		
Lys Arg Glu Cys Pro Ser Ile Phe Ala Trp Glu Ile Arg Asp Arg Leu			

105	110	115	120	
tta tcc gag ggg gtc tgt acc aac gat aac ata ccc agt gtg tca tca				437
Leu Ser Glu Gly Val Cys Thr Asn Asp Asn Ile Pro Ser Val Ser Ser				
125		130	135	
ata aac aga gtt ctt cgc aac ctg gct agc gaa aag caa cag atg ggc				485
Ile Asn Arg Val Leu Arg Asn Leu Ala Ser Glu Lys Gln Gln Met Gly				
140	145	150		
gca gac ggc atg tat gat aaa cta agg atg ttg aac ggg cag acc gga				533
Ala Asp Gly Met Tyr Asp Lys Leu Arg Met Leu Asn Gly Gln Thr Gly				
155	160	165		
agc tgg ggc aca cgc cct ggt tgg tat ccc ggg act tca gta cca ggg				581
Ser Trp Gly Thr Arg Pro Gly Trp Tyr Pro Gly Thr Ser Val Pro Gly				
170	175	180		
caa ccc acg caa gat ggc tgc cag caa cag gaa gga ggg gga gag aac				629
Gln Pro Thr Gln Asp Gly Cys Gln Gln Gln Glu Gly Gly Gly Glu Asn				
185	190	195	200	
acc aac tcc atc agt tct aac gga gaa gac tgg gat gaa gct cag atg				677
Thr Asn Ser Ile Ser Ser Asn Gly Glu Asp Ser Asp Glu Ala Gln Met				
205	210	215		
cga ctt cag ctg aag cgg aag ctg caa aga aat aga aca tct ttt acc				725
Arg Leu Gln Leu Lys Arg Lys Leu Gln Arg Asn Arg Thr Ser Phe Thr				
220	225	230		
caa gag cag att gag gct ctg gag aaa gag ttt gag agg acc cat tat				773
Gln Glu Gln Ile Glu Ala Leu Glu Lys Glu Phe Glu Arg Thr His Tyr				
235	240	245		
cca gat gtg ttt gcc cgg gaa aga cta gca gcc aaa ata gat cta cct				821
Pro Asp Val Phe Ala Arg Glu Arg Leu Ala Ala Lys Ile Asp Leu Pro				
250	255	260		
gaa gca aga ata cag gta tgg ttt tct aat cga agg gcc aaa tgg aga				869
Glu Ala Arg Ile Gln Val Trp Phe Ser Asn Arg Arg Ala Lys Trp Arg				
265	270	275	280	
aga gaa gag aaa ctg agg aac cag aga aga cag gcc agc aac act cct				917
Arg Glu Glu Lys Leu Arg Asn Gln Arg Arg Gln Ala Ser Asn Thr Pro				
285	290	295		
agt cac att cct atc agc agc agc ttc agt acc agt gtc tac cag cca				965
Ser His Ile Pro Ile Ser Ser Ser Phe Ser Thr Ser Val Tyr Gln Pro				

300

305

310

atc cca cag ccc acc aca cct gtc tcc tcc ttc aca tca ggt tcc atg 1013  
 ile pro gln pro thr thr pro val ser ser phe thr ser gly ser met  
 315 320 325

ttg ggc cga aca gac acc gcc ctc acc aac acg tac agt gct ttg cca 1061  
 leu gly arg thr asp thr ala leu thr asn thr tyr ser ala leu pro  
 330 335 340

ccc atg ccc agc ttc acc atg gca aac aac ctg cct atg caa ccc cca 1109  
 pro met pro ser phe thr met ala asn asn leu pro met gln pro pro  
 345 350 355 360

gtc ccc agt cag acc tcc tca tac tcg tgc atg ctg ccc acc agc ccg 1157  
 val pro ser gln thr ser ser tyr ser cys met leu pro thr ser pro  
 365 370 375

tca gtg aat ggg cgg agt tat gat acc tac acc cct ccg cac atg caa 1205  
 ser val asn gly arg ser tyr asp thr tyr thr pro pro his met gln  
 380 385 390

aca cac atg aac agt cag ccc atg ggc acc tcg ggg acc act tca aca 1253  
 thr his met asn ser gln pro met gly thr ser gly thr thr ser thr  
 395 400 405

gga ctc att tca cct gga gtg tca gtt ccc gtc caa gtt ccc ggg agt 1301  
 gly leu ile ser pro gly val ser val pro val gln val pro gly ser  
 410 415 420

gaa cct gac atg tct cag tac tgg cct cga tta cag taaagagaga 1347  
 glu pro asp met ser gln tyr trp pro arg leu gln  
 425 430 435

aggagagagc atgtgatcga gagaggaaat tgtgttcact ctgccaatga ctatgtggac 1407

acagcagttg ggtattcagg aaagaaagag aaatggcggt tagaagcact tcactttgta 1467

actgtcctga actggagccc gggaatggac tagaaccaag gaccttgcgt acagaaggca 1527

cggtatcagt tggaacaaat cttcattttg gtatccaaac ttttattcat tttggtgtat 1587

tattttgtaaa tgggcattgg tatgttataa tgaagaaaag aacaacacag gctgttggat 1647

cgcggtatctg tgttgcctcat gtggttggtt aaaggaaacc atgategaca agatttgcca 1707

tggatttaag agttttatca agatatatca aatacttctc cccatctgtt catagtttat 1767

ggactgatgt tccaagtttg tatcattcct ttgcatataa ttgaacctgg gacaacacac 1827

actagatata tgtaaaaact atctgttggt ttcccaaagg ttggt 1872

<210> 6

<211> 436

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 6

Met Gln Asn Ser His Ser Gly Val Asn Gln Leu Gly Gly Val Phe Val

1 5 10 15

Asn Gly Arg Pro Leu Pro Asp Ser Thr Arg Gln Lys Ile Val Glu Leu

20 25 30

Ala His Ser Gly Ala Arg Pro Cys Asp Ile Ser Arg Ile Leu Gln Thr

35 40 45

His Ala Asp Ala Lys Val Gln Val Leu Asp Asn Glu Asn Val Ser Asn

50 55 60

Gly Cys Val Ser Lys Ile Leu Gly Arg Tyr Tyr Glu Thr Gly Ser Ile

65 70 75 80

Arg Pro Arg Ala Ile Gly Gly Ser Lys Pro Arg Val Ala Thr Pro Glu

85 90 95

Val Val Ser Lys Ile Ala Gln Tyr Lys Arg Glu Cys Pro Ser Ile Phe

100 105 110

Ala Trp Glu Ile Arg Asp Arg Leu Leu Ser Glu Gly Val Cys Thr Asn

115 120 125

Asp Asn Ile Pro Ser Val Ser Ser Ile Asn Arg Val Leu Arg Asn Leu

130 135 140

Ala Ser Glu Lys Gln Gln Met Gly Ala Asp Gly Met Tyr Asp Lys Leu

145 150 155 160

Arg Met Leu Asn Gly Gln Thr Gly Ser Trp Gly Thr Arg Pro Gly Trp

165 170 175

Tyr Pro Gly Thr Ser Val Pro Gly Gln Pro Thr Gln Asp Gly Cys Gln

180 185 190

Gln Gln Glu Gly Gly Gly Glu Asn Thr Asn Ser Ile Ser Ser Asn Gly

195	200	205
Glu Asp Ser Asp Glu Ala Gln Met Arg Leu Gln Leu Lys Arg Lys Leu		
210	215	220
Gln Arg Asn Arg Thr Ser Phe Thr Gln Glu Gln Ile Glu Ala Leu Glu		
225	230	235 240
Lys Glu Phe Glu Arg Thr His Tyr Pro Asp Val Phe Ala Arg Glu Arg		
245	250	255
Leu Ala Ala Lys Ile Asp Leu Pro Glu Ala Arg Ile Gln Val Trp Phe		
260	265	270
Ser Asn Arg Arg Ala Lys Trp Arg Arg Glu Glu Lys Leu Arg Asn Gln		
275	280	285
Arg Arg Gln Ala Ser Asn Thr Pro Ser His Ile Pro Ile Ser Ser Ser		
290	295	300
Phe Ser Thr Ser Val Tyr Gln Pro Ile Pro Gln Pro Thr Thr Pro Val		
305	310	315 320
Ser Ser Phe Thr Ser Gly Ser Met Leu Gly Arg Thr Asp Thr Ala Leu		
325	330	335
Thr Asn Thr Tyr Ser Ala Leu Pro Pro Met Pro Ser Phe Thr Met Ala		
340	345	350
Asn Asn Leu Pro Met Gln Pro Pro Val Pro Ser Gln Thr Ser Ser Tyr		
355	360	365
Ser Cys Met Leu Pro Thr Ser Pro Ser Val Asn Gly Arg Ser Tyr Asp		
370	375	380
Thr Tyr Thr Pro Pro His Met Gln Thr His Met Asn Ser Gln Pro Met		
385	390	395 400
Gly Thr Ser Gly Thr Thr Ser Thr Gly Leu Ile Ser Pro Gly Val Ser		
405	410	415
Val Pro Val Gln Val Pro Gly Ser Glu Pro Asp Met Ser Gln Tyr Trp		
420	425	430
Pro Arg Leu Gln		
435		

<210> 7  
 <211> 861  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (160)..(801)

<400> 7  
 attctttttga gtcgggagaa ctaggtaaca attcggaaac tccaaagggt ggtatgagggg 60  
 cgcgcgggggt gtgtgtgggg gatactctgg tccccctgac agtgacctct aagtcagagg 120  
 ctggcacaca cacaccttcc attttttccc aaccgcagg atg gcg cct cat ccc 174  
 Met Ala Pro His Pro  
 1 5  
 ttg gat gcg ctc acc atc caa gtg tcc cca gag aca caa caa cct ttt 222  
 Leu Asp Ala Leu Thr Ile Gln Val Ser Pro Glu Thr Gln Gln Pro Phe  
 10 15 20  
 ccc gga gcc tcg gac cac gaa gtg ctc agt tcc aat tcc acc cca cct 270  
 Pro Gly Ala Ser Asp His Glu Val Leu Ser Ser Asn Ser Thr Pro Pro  
 25 30 35  
 agc ccc act ctc ata cct agg gac tgc tcc gaa gca gaa gtg ggt gac 318  
 Ser Pro Thr Leu Ile Pro Arg Asp Cys Ser Glu Ala Glu Val Gly Asp  
 40 45 50  
 tgc cga ggg acc tcg agg aag ctc cgc gcc cga cgc gga ggg cgc aac 366  
 Cys Arg Gly Thr Ser Arg Lys Leu Arg Ala Arg Arg Gly Gly Arg Asn  
 55 60 65  
 agg ccc aag agc gag ttg gca ctc agc aaa cag cga aga agc cgg cgc 414  
 Arg Pro Lys Ser Glu Leu Ala Leu Ser Lys Gln Arg Arg Ser Arg Arg  
 70 75 80 85  
 aag aag gcc aat gat cgg gag cgc aat cgc atg cac aac ctc aac tcg 462  
 Lys Lys Ala Asn Asp Arg Glu Arg Asn Arg Met His Asn Leu Asn Ser  
 90 95 100  
 gcg ctg gat gcg ctg cgc ggt gtc ctg ccc acc ttc ccg gat gac gcc 510  
 Ala Leu Asp Ala Leu Arg Gly Val Leu Pro Thr Phe Pro Asp Asp Ala  
 105 110 115  
 aaa ctt aca aag atc gag acc ctg cgc ttc gcc cac aac tac atc tgg 558

Lys Leu Thr Lys Ile Glu Thr Leu Arg Phe Ala His Asn Tyr Ile Trp  
120 125 130

gca ctg act cag acg ctg cgc ata gcg gac cac agc ttc tat ggc ccg 606  
Ala Leu Thr Gln Thr Leu Arg Ile Ala Asp His Ser Phe Tyr Gly Pro  
135 140 145

gag ccc cct gtg ccc tgt gga gag ctg ggg agc ccc gga ggt ggc tcc 654  
Glu Pro Pro Val Pro Cys Gly Glu Leu Gly Ser Pro Gly Gly Gly Ser  
150 155 160 165

aac ggg gac tgg ggc tct atc tac tcc cca gtc tcc caa gcg ggt aac 702  
Asn Gly Asp Trp Gly Ser Ile Tyr Ser Pro Val Ser Gln Ala Gly Asn  
170 175 180

ctg agc ccc acg gcc tca ttg gag gaa ttc cct ggc ctg cag gtg ccc 750  
Leu Ser Pro Thr Ala Ser Leu Glu Glu Phe Pro Gly Leu Gln Val Pro  
185 190 195

agc tcc cca tcc tat ctg ctc ccg gga gca ctg gtg ttc tca gac ttc 798  
Ser Ser Pro Ser Tyr Leu Leu Pro Gly Ala Leu Val Phe Ser Asp Phe  
200 205 210

ttg tgaagagacc tgtctggctc tgggtggtgg gtgctagtgg aaagggaggg 851  
Leu

gaccacagcc 861

<210> 8

<211> 214

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 8

Met Ala Pro His Pro Leu Asp Ala Leu Thr Ile Gln Val Ser Pro Glu  
1 5 10 15

Thr Gln Gln Pro Phe Pro Gly Ala Ser Asp His Glu Val Leu Ser Ser  
20 25 30

Asn Ser Thr Pro Pro Ser Pro Thr Leu Ile Pro Arg Asp Cys Ser Glu  
35 40 45

Ala Glu Val Gly Asp Cys Arg Gly Thr Ser Arg Lys Leu Arg Ala Arg  
50 55 60

Arg Gly Gly Arg Asn Arg Pro Lys Ser Glu Leu Ala Leu Ser Lys Gln

```
<210> 10
<211> 21
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 10
agctgagggc agcaatctga c
```



<210> 11  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Mus musculus

<400> 11  
cagcccttag tgaccagc

18

<210> 12  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Mus musculus

<400> 12  
atgctggtgc agcactga

18

<210> 13  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Mus musculus

<400> 13  
cgcctgatcc cttggatg

18

<210> 14  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Mus musculus

<400> 14  
cagtcaccca cttctgct

18

<210> 15  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Mus musculus

<400> 15  
ctttcccggtg gatgaaatcc

20

<210> 16  
<211> 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 16

21

gtcaagttca acatcactgc c

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 17

20

gtttgtacgg gatcaaagtc

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 18

20

atgctgcgtt tcttgctctt

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 19

20

tcactgtgcc tgaacttacc

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 20

20

ggaacatagc cgtaaactgc

## Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein neues Verfahren zur Differenzierung von Stammzellen in Insulin-produzierende Zellen, durch Kultivierung solcher Zellen  
5 in eigens definierten Medien und optimalerweise durch Aktivierung eines oder mehrere Gene, die in die Beta-Zelldifferenzierung involviert sind. Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin Anwendungen im medizinischen (insbesondere Diabetes) Bereich, die sich direkt aus dem Verfahren der Erfindung ergeben. Außerdem betrifft die vorliegende Erfindung Anwendungen  
10 zur Identifizierung und Charakterisierung von Verbindungen mit therapeutischen medizinischen Wirkungen oder toxikologischen Wirkungen, welche sich direkt aus dem Verfahren der Erfindung ergeben.

25182P WO/WW

PCT/EP 02/04362

DeveloGen Aktiengesellschaft für entwicklungsbiologische Forschung

5

## Ansprüche

1. Verfahren zum Differenzieren von Stammzellen in Insulin-produzierende Zellen, umfassend:

Kultivierung von Stammzellen in einem geeigneten Medium und Aktivierung von mindestens einem Gen, das in die Beta-Zell-differenzierung involviert ist.

10

2. Verfahren nach Anspruch 1, weiter umfassend:

Aggregieren der kultivierten Stammzellen, um Embryoid-Körper zu bilden, Kultivierung der Embryoid-Körper in einem Differenzierungsmedium, das eine  $\beta$ -Zelldifferenzierung steigert, Identifizierung, und gegebenenfalls Selektion Insulin-produzierender Zellen.

15

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, worin die Stammzellen ausgewählt sind aus embryonalen Stammzellen, adulten Stammzellen, somatischen Stammzellen und primordialen Keimzellen.

20

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-3, worin die Stammzellen humanen Ursprungs sind.

25

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-4, worin die Gene, die in die  $\beta$ -Zelldifferenzierung involviert sind, ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus Pdx1, Pax4, Pax6, ngn3, Nkx6,1, Nkx6,2, Nkx2,2, HB9, BETA2, NeuroD, Isl1, HNF1-alpha, HNF1-beta, HNF3 und Kombinationen davon.

30

6. Verfahren nach Anspruch 5, worin die Gene ausgewählt sind aus Pdx1, Pax4, Pax6, ngn3 und Kombinationen davon.
7. Verfahren nach Anspruch 5 oder 6, worin die Gene humanen Ursprungs sind.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-7, worin die Genaktivierung eine Lieferung eines pankreatischen Gens in Stammzellen umfasst.
9. Verfahren nach Anspruch 8, worin die Genlieferung eine Transfektion von Stammzellen mit einer cDNA von mindestens einem pankreatischen Gen unter der Kontrolle eines regulatorischen Region, die die Transkriptionsinitiation ermöglicht, umfasst.
10. Verfahren nach Anspruch 8, worin die Genlieferung einen DNA-Transfer unter Verwendung eines viralen Liefersystems umfasst.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-7, worin die Genaktivierung eine Lieferung eines Proteinprodukts eines pankreatischen Gens in Stammzellen umfasst.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 2-11, worin die Embryoid-Körper durch ein Verfahren mit hängenden Tropfen gebildet werden.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 2-12, worin das Differenzierungsmedium auf Iscove's modifiziertem Dulbecco-Medium (IMDM) basiert, ergänzt mit fötalem Kälberserum, L-Glutamin, nicht essentiellen Aminosäuren und  $\alpha$ -Monothioglycerol, gegebenenfalls enthaltend EGF, bFGF, Progesteron, Wachstumshormon, Follistatin und/oder Activin.

14. Verfahren nach Anspruch 13, worin das Differenzierungsmedium weiterhin extrazelluläre Matrix-Proteine, Collagene und/oder Gemische aus Wachstumsfaktoren und extrazellulären Matrix-Proteinen enthält.
- 5 15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-14, worin nach einer Differenzierungszeit von 15 Tagen mindestens 20% Insulin-produzierende Zellen erhalten werden.
- 10 16. Verfahren nach Anspruch 15, worin mindestens 40% Insulin-produzierende Zellen erhalten werden.
17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-16, weiterhin enthaltend eine Selektion von Nestin-positiven Zellen.
- 15 18. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-17, worin die Insulin-produzierenden Zellen für pharmazeutische Anwendungen verwendet werden.
- 20 19. Verfahren nach Anspruch 18 zur Behandlung von pankreatischen Erkrankungen, einem Stoffwechselsyndrom und Stoffwechselerkrankungen mit beeinträchtigten Glukosespiegeln, so wie Diabetes, Hyperglykämie und/oder beeinträchtigter Glukosetoleranz.
- 25 20. Verfahren nach Anspruch 18 oder 19, worin zwischen 3000 und 100000 äquivalent differenzierte Insulin-produzierende Zellen pro Kilogramm Körpergewicht verabreicht werden.
21. Zellzusammensetzung, umfassend Insulin-produzierende Zellen, die durch das Verfahren nach einem der Ansprüche 1-17 erhältlich sind.

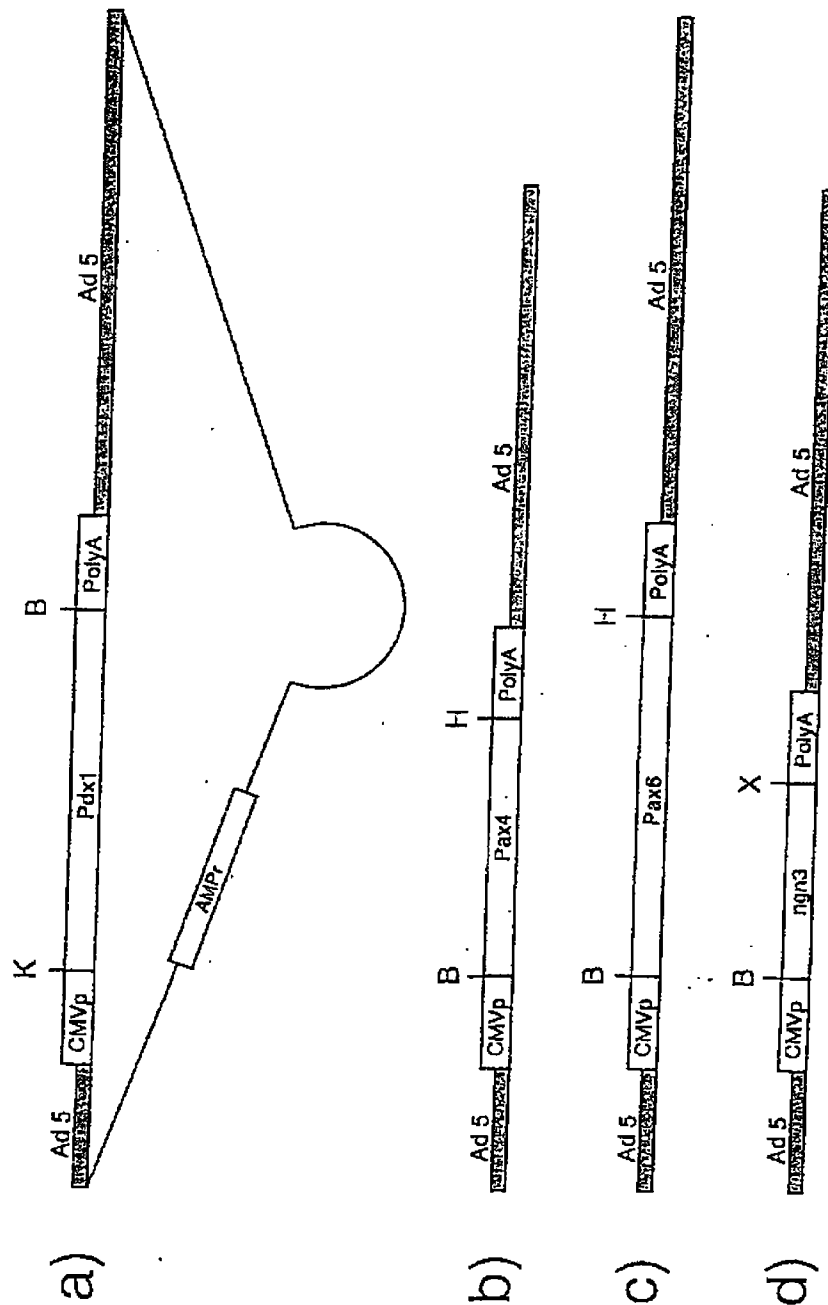
22. Zusammensetzung nach Anspruch 21, umfassend nach einer Inkubationszeit von 15 Tagen mindestens 20% Insulin-produzierende Zellen
- 5 23. Zusammensetzung nach Anspruch 22, umfassend mindestens 40% Insulin-produzierende Zellen
24. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 21-23, umfassend ein Verhältnis von Insulin-produzierenden Zellen zu Glucagon-produzierende Zellen von mindestens 2:1.  
10
25. Zusammensetzung nach Anspruch 24, umfassend ein Verhältnis von mindestens 5:1.
- 15 26. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 21-25, die nach Stimulierung mit 27,7,mM Glucose einen mindestens 2fachen Anstieg in der Insulinsekretion zeigt.
- 20 27. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 21-26, die eine pharmazeutische Zusammensetzung ist.
28. Zusammensetzung nach Anspruch 27 zur Behandlung von pankreatischen Erkrankungen, einem Stoffwechselsyndrom und Stoffwechsel-erkrankungen mit beeinträchtigten Glukosespiegeln, so wie Diabetes,  
25 Hyperglykämie und/oder beeinträchtigter Glukosetoleranz.
29. Zusammensetzung nach Anspruch 27 oder 28, die mittels Transplantation verabreicht wird oder in einer medizinischen Vorrichtung verwendet wird.

30. Verfahren zur Identifizierung und/oder Charakterisierung von Verbindungen, die geeignet sind, die Differenzierung von Stammzellen in Insulin-produzierende Zellen zu modulieren, umfassend:  
in Kontakt bringen einer zu testenden Verbindung mit Stammzellen unter Bedingungen, worin die Stammzellen imstande sind, in Insulin-Produzierende Zellen zu differenzieren, und Ermittlung der Wirkung der Verbindung auf den Differenzierungsprozess.
31. Verfahren nach Anspruch 30, umfassend eine Transfektion von Stammzellen mit einem DNA-Konstrukt, das ein Reportergen unter regulatorischer Kontrolle eines Gens, das in die  $\beta$ -Zelldifferenzierung involviert ist, enthält, in Kontakt bringen der transfizierten Zellen mit einer zu testenden Verbindung, und Ermittlung der Aktivität des Reportergens.
32. Verfahren nach Anspruch 30 oder 31, umfassen in Kontakt bringen von Embryoid-Körpern, die in einem Differenzierungsmedium kultiviert werden, das eine  $\beta$ -Zelldifferenzierung steigert, mit einer zu testenden Verbindung, und Ermittlung der Differenzierung in Insulin-produzierende Zellen.



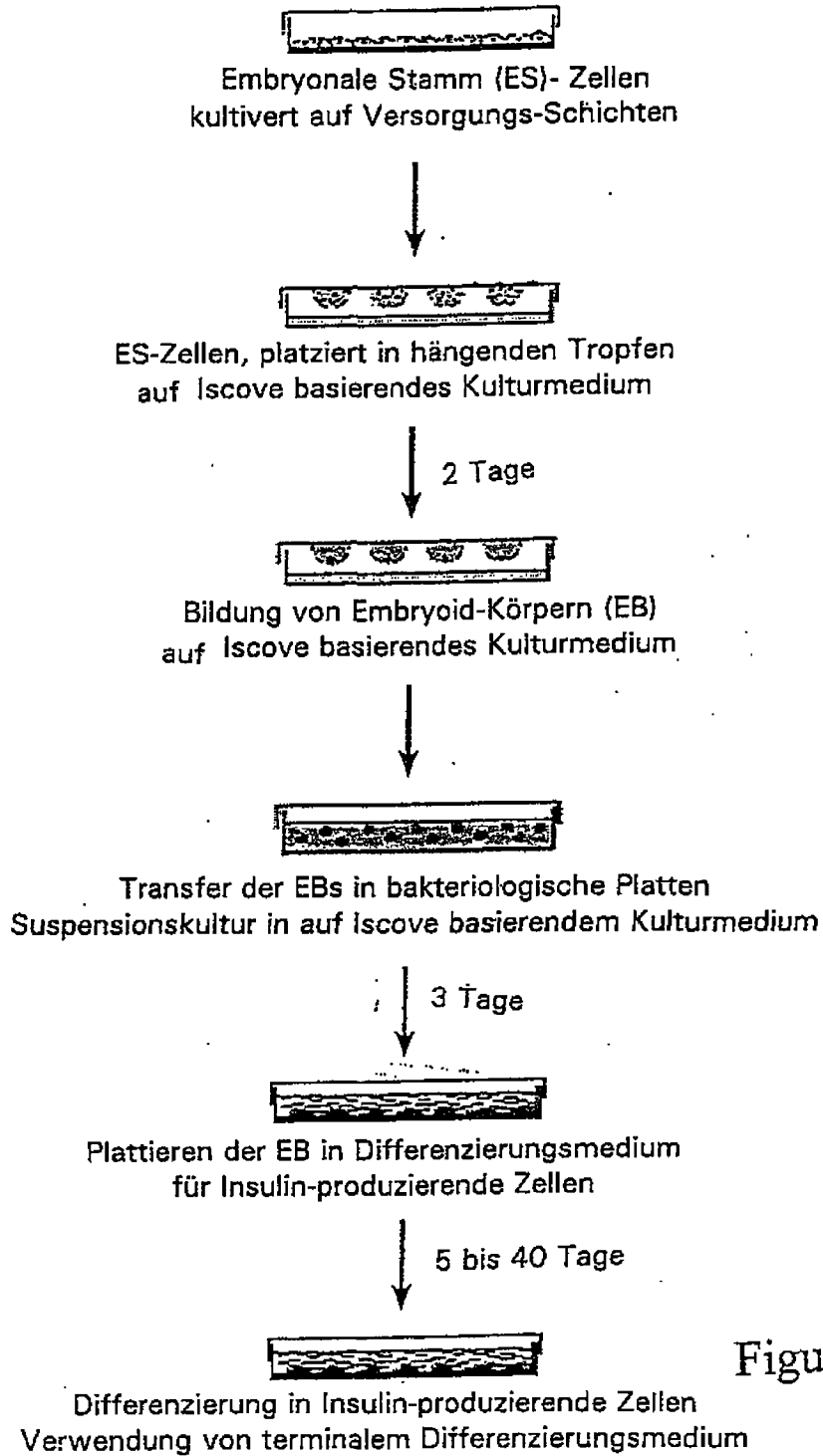
- Leerseite -

1/11



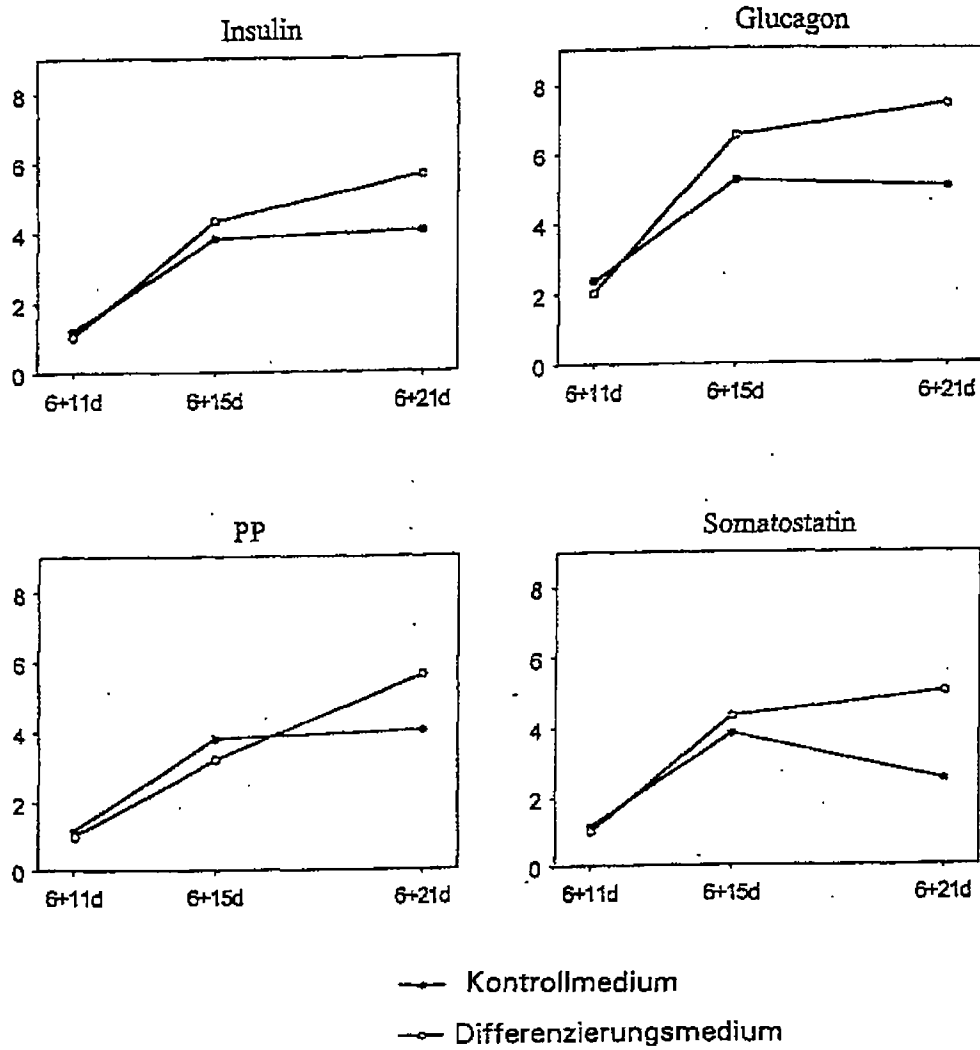
Figur 1

2/11



Figur 2

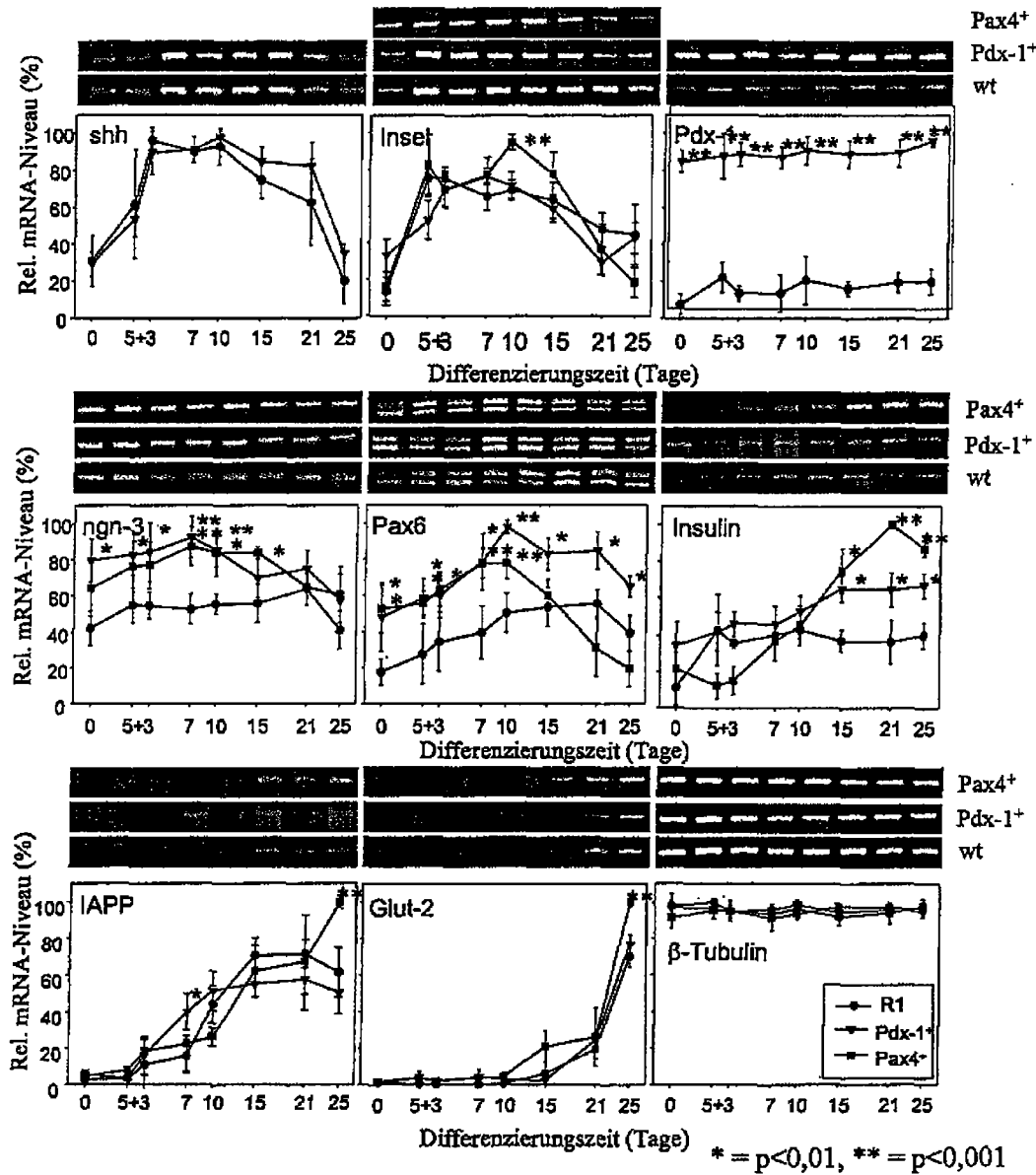
3/11



Figur 3

4/11

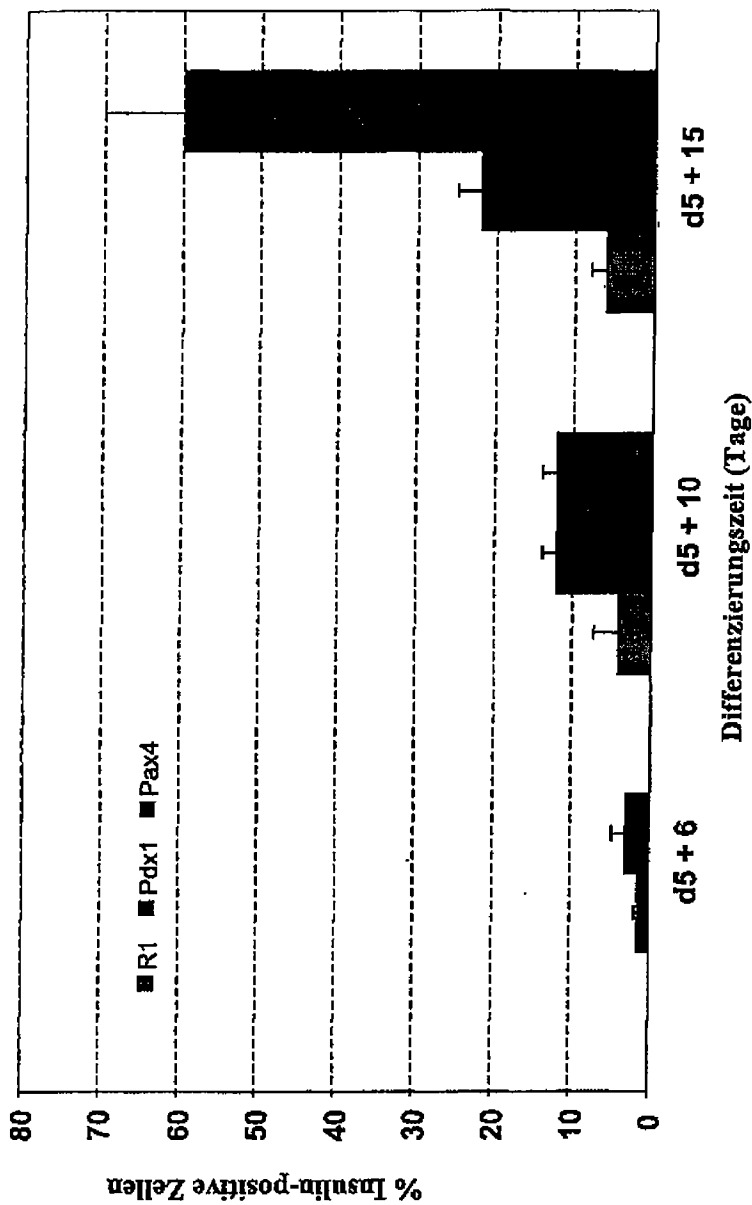
Analyse des RNA-Niveaus von Genen, die in pankreatische  $\beta$ -Zellentwicklung involviert sind, in sich differenzierenden wt-, Pdx-1<sup>-</sup>- und Pax4<sup>-</sup>-ES-Zellen



Figur 4

5/11

Differenzierung von Maus-ES-Zellen in Insulin-produzierende Zellen



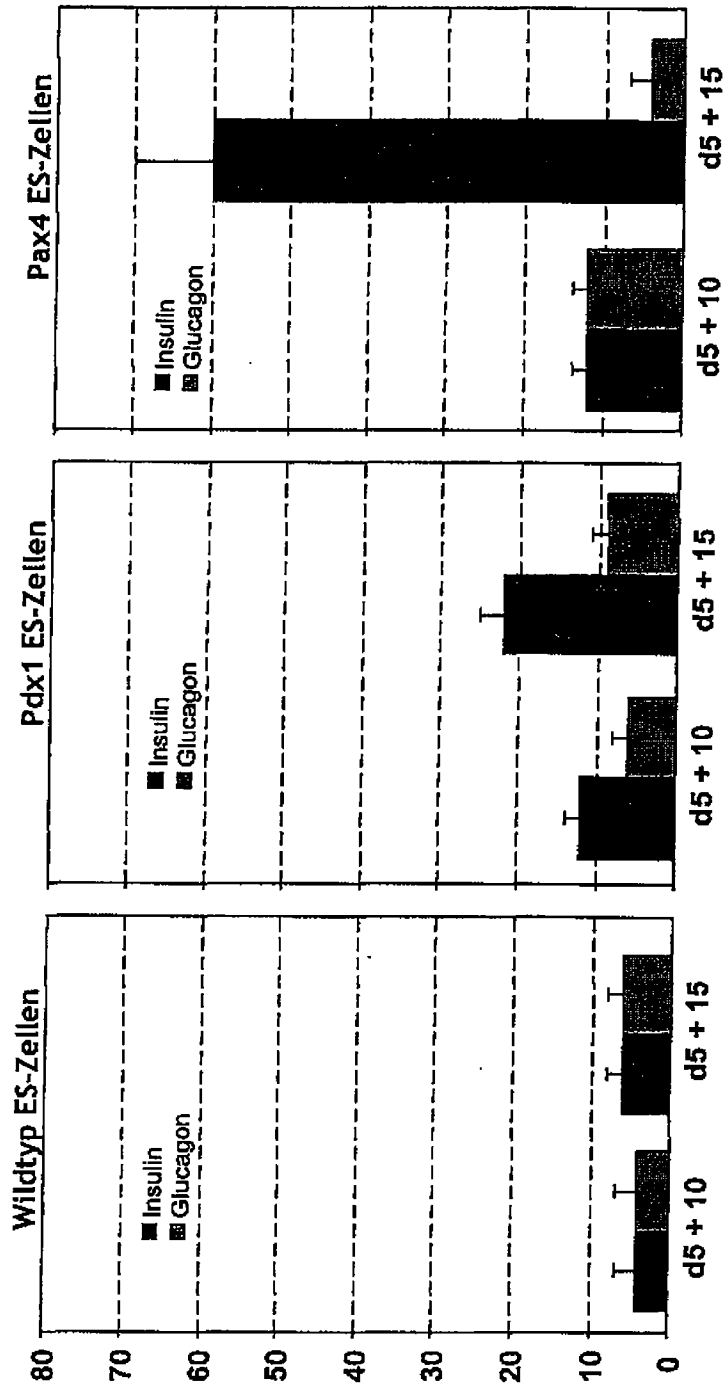
Figur 5

13.05.03

DE 102 90 025 T1

6/11

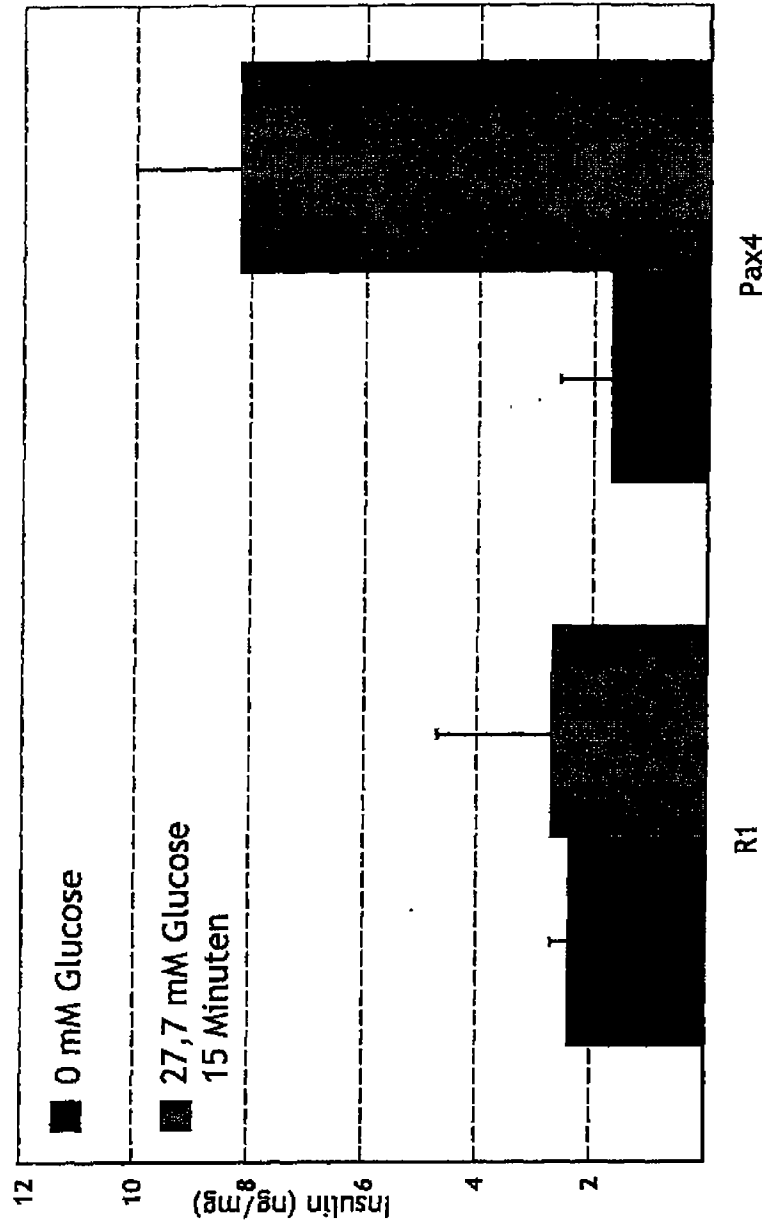
## Insulin-produzierende Zellen gegen Glucagon-produzierende Zellen



Figur 6

7/11

Von Pax4 ES-Zellen abgeleitete Insulin-Zellen reagieren auf Glucose

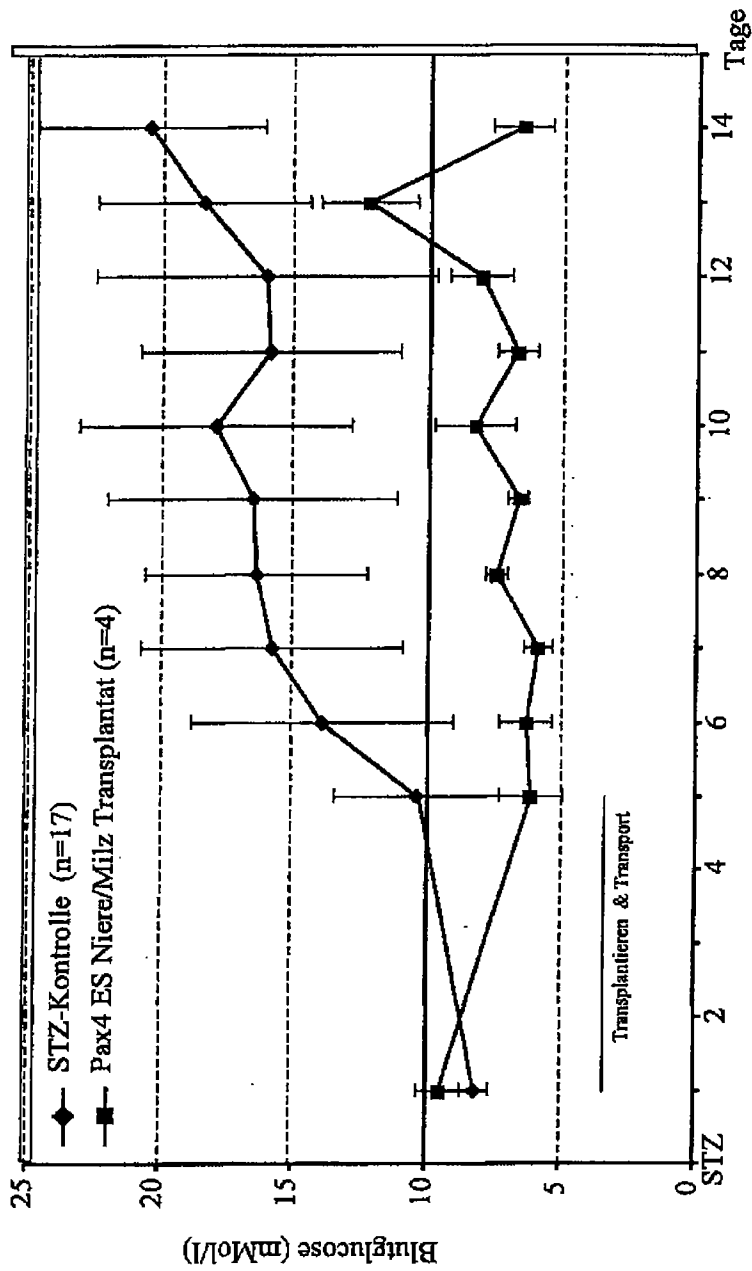


Figur 7



13.06.03  
DE 102 90 025 T1

8/11



Figur 8

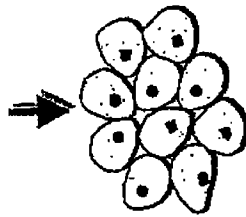
9/11

# Medikament-Screening-Strategie

## Hochdurchsatz-Screening

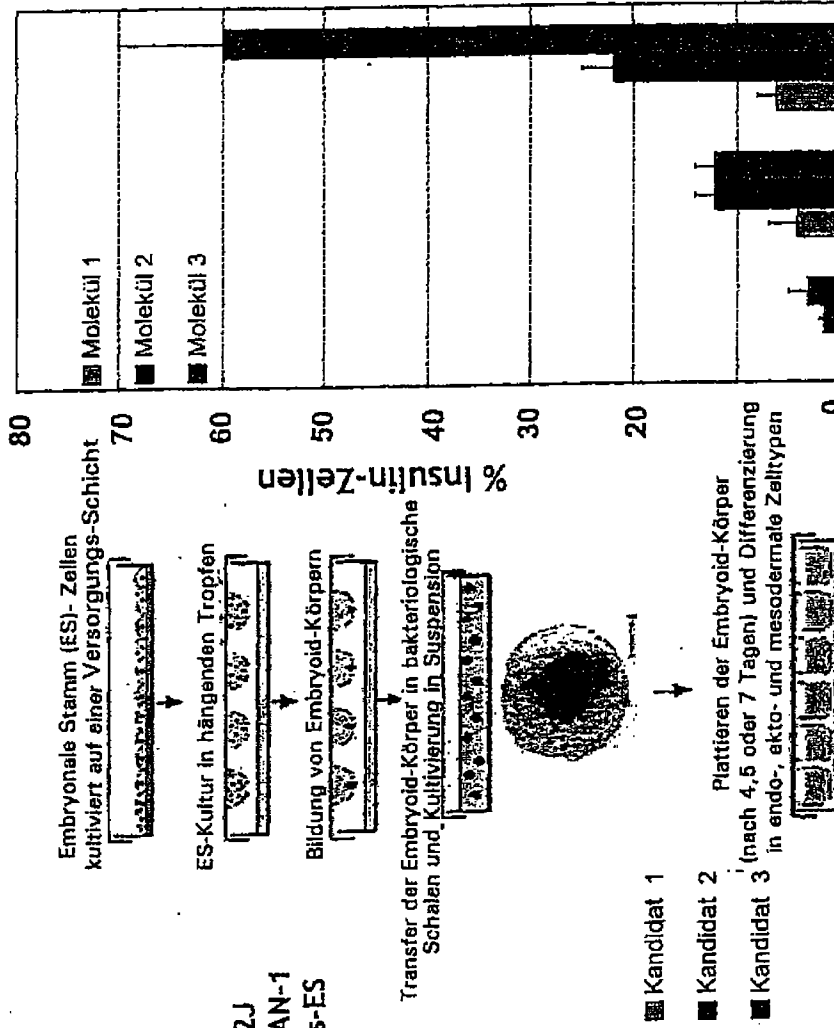
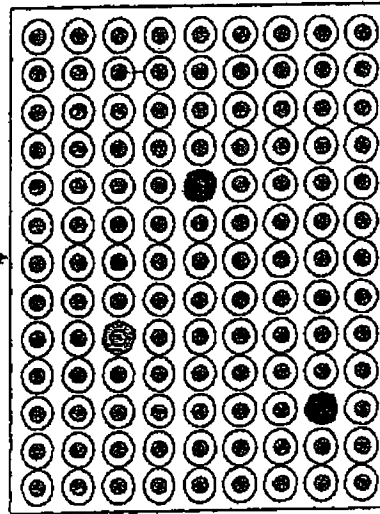
## Medium-Durchsatz-Validierung

Pax-Promoter Reporter-Gen



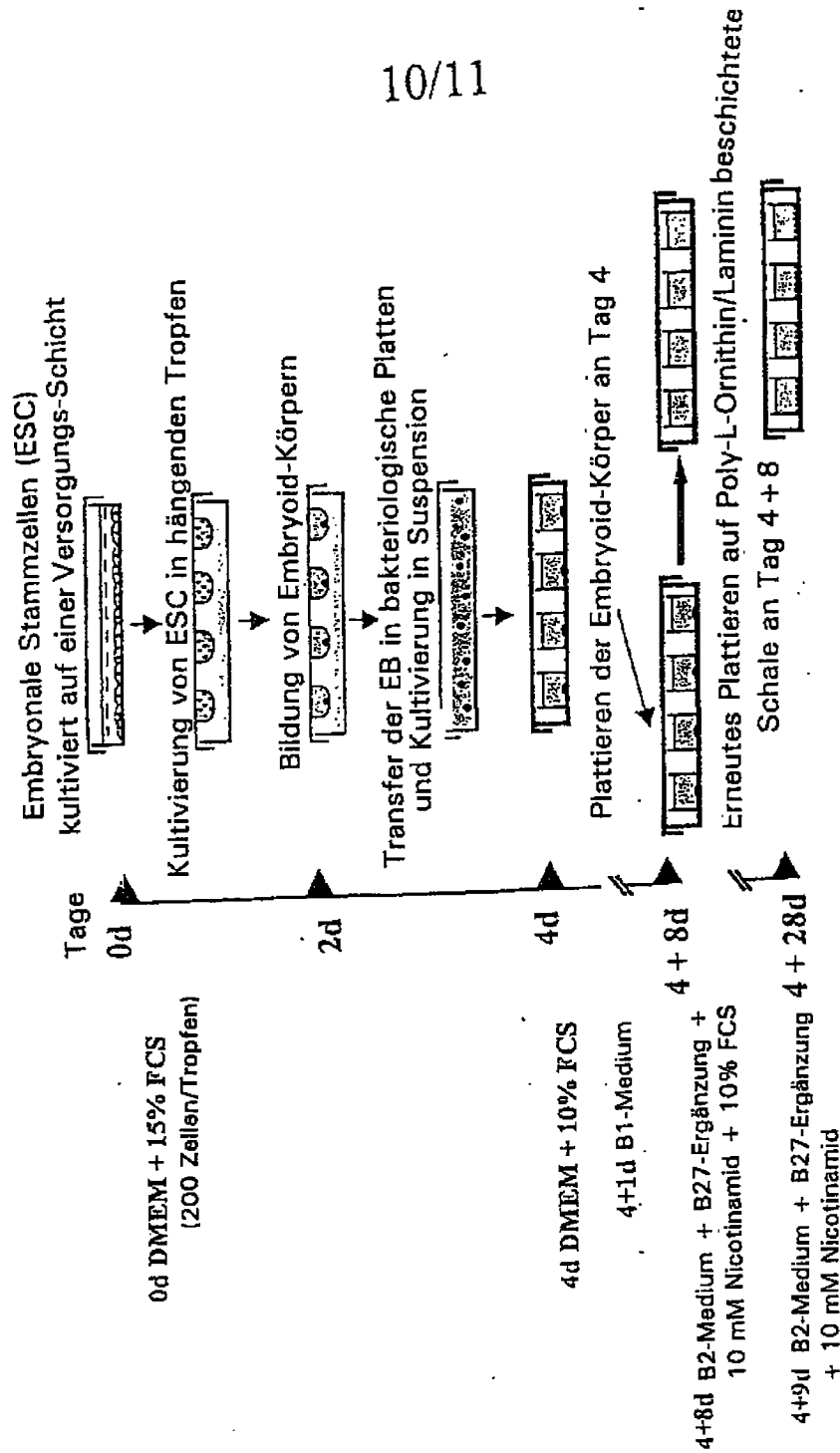
- AR42J
- CAPAN-1
- Maus-ES

Zelllinie



Figur 9

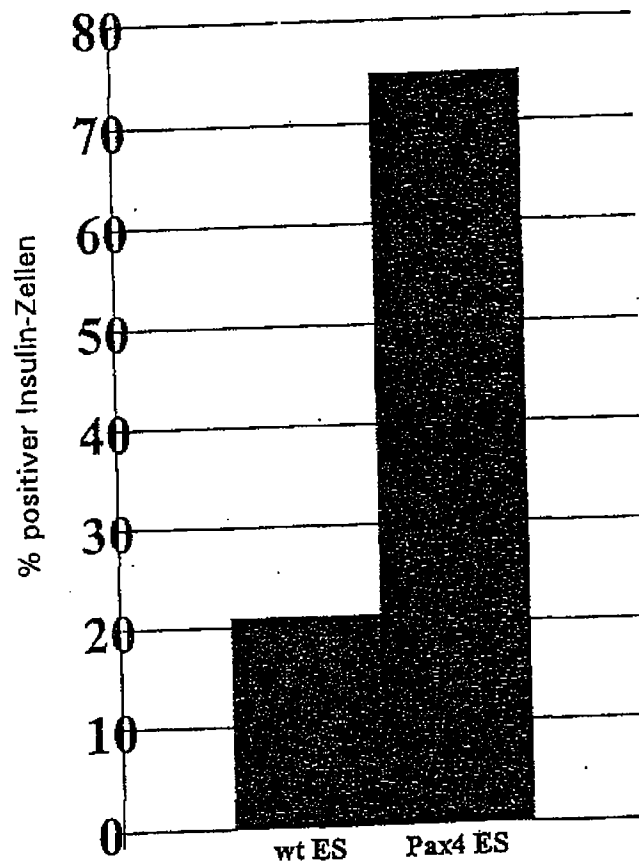
10/11



Figur 10

13.06.03  
DE 102 90 025 T1

11/11



Figur 11